

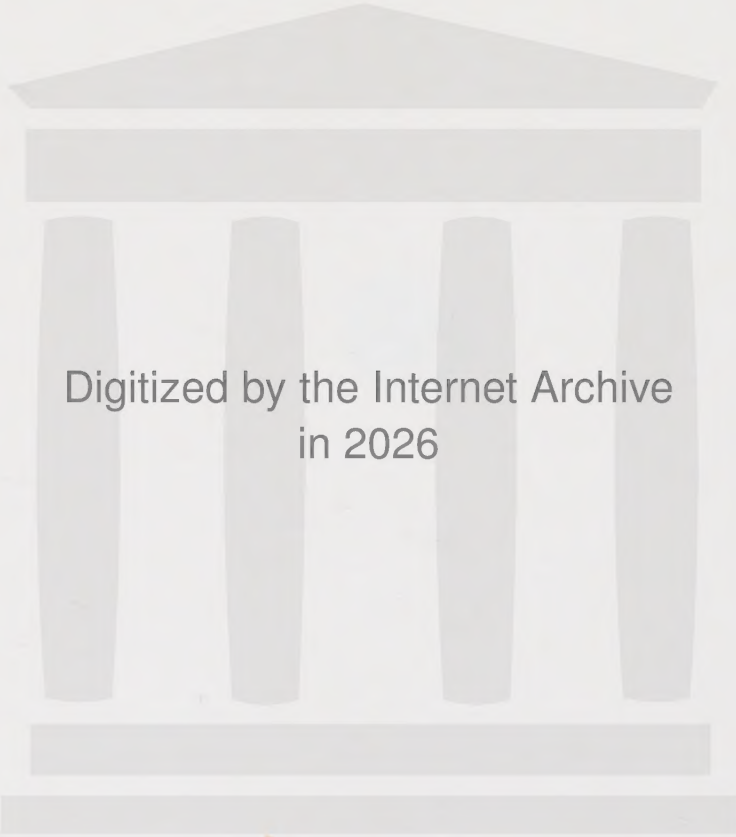
ENZYMDEFEKTE IM HARNSTOFFZYKLUS:
ENTWICKLUNG EINER NEUEN RADIOISOTOPISCHEN
METHODE FÜR DIE BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT
DER CARBAMYLPHOSPHATSYNTHETASE I UND DER
ORNITHINTRANSCARBAMYLASE MIT BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER PRÄNATALEN DIAGNOSTIK
IN CHORIONZOTTEN

von
Ulrich Heininger
aus München

1988

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555408_0027

Aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Universität München

Vorstand: Prof.Dr. H.-B. Hadorn

ENZYMDEFEKTE IM HARNSTOFFZYKLUS:
ENTWICKLUNG EINER NEUEN RADIOISOTOPISCHEN
METHODE FÜR DIE BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT
DER CARBAMYLPHOSPHATSYNTHETASE I UND DER
ORNITHINTRANSCARBAMYLASE MIT BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER PRÄNATALEN DIAGNOSTIK
IN CHORIONZOTTEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrich Heiningner

aus
München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr. W. Endres
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. H.-B. Hadorn Prof.Dr. H. Versmold
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Y.S. Shin
Dekan:	Prof.Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.1.88

Mein besonderer Dank gilt

Frau Dr.rer.nat.

YOON S. SHIN

für ihre intensive Betreuung und Hilfe,
ohne die diese Arbeit nicht zustandege-
kommen wäre,

Herrn Prof.Dr.

W. ENDRES

für seine Anregungen zur Thematik und
Unterstützung der Versuche,

Frau

B. KRUIS

und

Herrn

M. RIETH

für deren freundliche labortechnische
Hilfe.

GEWIDMET

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Der Harnstoffzyklus, Allgemeines	1
1.2	Enzymdefekte im Harnstoffzyklus	4
1.2.1	Carbamylphosphatsynthetase-I-Mangel	4
1.2.2	Ornithintranscarbamylase-Mangel	5
1.2.3	Diagnose der Harnstoffzyklusenzymdefekte	8
1.2.4	Abbauwege des Ammoniak bei Harnstoff- zyklusenzymdefekten	8
1.3	Differentialdiagnose und Therapie der Hyperammonämie	10
1.4	Ziele der vorliegenden Studie	13
2.	<u>MATERIAL</u>	
2.1	Blut- und Gewebeproben	14
2.2	Chemikalien	14
3.	<u>DURCHFÜHRUNG</u>	
3.1	Probenvorbereitung	16
3.1.1	Erythrozytenpräparation	16
3.1.2	Leukozytenpräparation	16
3.1.3	Präparation der Gewebeproben	16
3.2	Proteinbestimmung nach Lowry	17
3.3	Bestimmung der Ornithintranscarbamylase	18
3.3.1	Testansatz	18
3.3.2	Trennung des Produktes vom Substrat	20
3.3.3	Berechnung der Enzymaktivität	24
3.3.4	Enzymkinetik	24

3.4	Bestimmung der Carbamylphosphatsynthetase I	26
3.4.1	Testansatz	26
3.4.2	Trennung des Produktes vom Substrat	28
3.4.3	Berechnung der Enzymaktivität	29
3.4.4	Enzymkinetik	30

4. ERGEBNISSE

4.1	Ornithintranscarbamylase-Messung	32
4.1.1	Protein- und Zeitabhängigkeit	32
4.1.2	Ornithintranscarbamylase in Erythrozyten	34
4.1.3	Ornithintranscarbamylase in Gewebeproben	35
4.1.4	Enzymkinetik	41
4.2	Carbamylphosphatsynthetase-I-Messung	45
4.2.1	Carbamylphosphatsynthetase I in Gewebeproben	45
4.2.2	Enzymkinetik	49

5. DISKUSSION

5.1	Methode	53
5.2	Ergebnisse	55
5.2.1	Ornithintranscarbamylase-Messung	55
5.2.2	Ornithintranscarbamylase-Kinetik	58
5.2.3	Carbamylphosphatsynthetase-I-Messung	60
5.2.4	Carbamylphosphatsynthetase-I-Kinetik	62
5.3	Einsatz der entwickelten Methode in der pränatalen Diagnostik	63

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. BIBLIOGRAPHIE

8. LEBENS LAUF

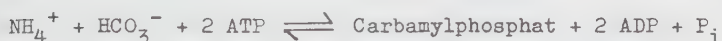
1. EINLEITUNG

1.1 Der Harnstoffzyklus, Allgemeines

Ammoniak, das toxische Endprodukt des Aminosäurenstoffwechsels, wird in der Leber in mehreren Schritten zu Harnstoff umgewandelt, welcher letztendlich über die Nieren ausgeschieden wird.

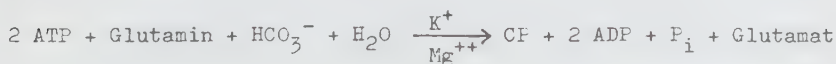
Die Biosynthese des Harnstoffs ist, wie Krebs und Henseleit schon 1932 postulierten, ein Kreisprozeß und wird deshalb Harnstoffzyklus genannt. Hauptort der Synthese ist, was Bollmann et al. 1924 zeigen konnten (1), die Leber, jedoch können geringere Enzymaktivitäten auch in anderen Organen nachgewiesen werden.

Der erste Schritt der Harnstoffbildung, die Synthese von Carbamylphosphat (CP) aus Ammoniak und Bicarbonat unter Verbrauch von 2 Molekülen ATP, wird von dem Enzym Carbamylphosphatsynthetase I (CPS I) katalysiert:



Als Kofaktoren werden Magnesium und N-Acetylglutamat benötigt, welches durch die Acetylglutamatsynthetase aus Acetyl-CoA und Glutamat hergestellt wird.

Die CPS I ist mitochondrial lokalisiert. Ihr Isoenzym, die CPS II, dagegen befindet sich im Zytosol und ist in den meisten Körperzellen nachweisbar (2). Sie stellt Carbamylphosphat aus Glutamin und Bikarbonat für die de-novo-Synthese von Pyrimidinen bereit:



Die Aktivität der CPS II ist sehr gering im Vergleich zur CPS I. (3)

Der zweite Schritt ist die Übertragung des Carbamylrestes des CP auf Ornithin, eine nichtproteinogene Aminosäure, durch die Ornithintranscarbamylase (OTC):



Diese beiden ersten Schritte finden im Mitochondrium der Zelle statt. Citrullin tritt nun ins Zytosol über, wo es mit Hilfe der Argininosuccinatsynthetase mit Aspartat zu Argininosuccinat kondensiert:



Die nun folgende Reaktion ist die Spaltung von Argininosuccinat in Arginin und Fumarat durch das Enzym Argininosuccinase:



Das entstandene Fumarat kann in den Citratzyklus einmünden, wo aus ihm über Oxalacetat Aspartat regeneriert wird. Arginin wird durch die Arginase in Harnstoff und Ornithin gespalten:



Diese Reaktion ist - im Gegensatz zu den vorhergenannten - irreversibel.

Der Harnstoff wird über die Nieren ausgeschieden, Ornithin tritt aus dem Zytosol ins Mitochondrium über, wo es wieder mit Carbamylphosphat reagiert und sich somit der Kreisprozeß schließt.

Damit entsteht 1 mol Harnstoff aus 1 mol Bicarbonat, 1 mol Ammoniak und der Aminogruppe des Aspartats unter Verbrauch von 1 mol ATP (4 mol ATP werden zur Synthese

benötigt, 3 mol jedoch bei der Regeneration von Aspartat aus Fumarat wiedergewonnen).

Die genannten Schritte des Harnstoffzyklus veranschaulicht Abb.1:

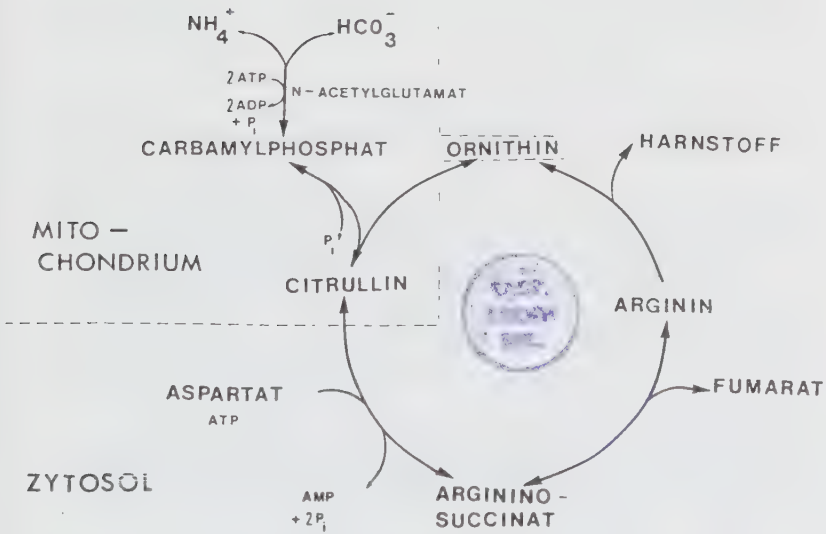


Abb.1: Der Harnstoffzyklus

1.2 Enzymdefekte im Harnstoffzyklus

Bei den 1958 - 1969 erstmals beschriebenen Enzymdefekten des Harnstoffzyklus (4,5,6,7,8) steht als gemeinsames Leitsymptom die Hyperammonämie (1.3) klinisch im Vordergrund.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit den Enzymen Carbamylphosphatsynthetase I (CPS I) und Ornithintranscarbamylase (OTC), auf deren Mangelzustände im folgenden näher eingegangen wird.

1.2.1 Carbamylphosphatsynthetase-I-Mangel

Man unterscheidet zwei Varianten dieses autosomal-rezessiv vererbten Krankheitsbildes: den kompletten CPS-I-Mangel mit sehr geringer oder nicht nachweisbarer Enzymaktivität und den partiellen CPS-I-Mangel mit unterschiedlich stark ausgeprägter Aktivitätsverminderung.

Erstmals beschrieben wurde diese auch unter dem früheren Namen kongenitale Hyperammonämie Typ I bekannte Erkrankung 1964 von Freeman et al. (7).

Beim kompletten Enzymmangel beginnt die hyperammonämische Symptomatik charakteristischerweise in der Neonatalperiode mit Erbrechen, Lethargie bis hin zum Koma, Hypothermie, und Hypotonie oder Spastizität. Serumuntersuchungen zu diesem Zeitpunkt zeigen eine ausgeprägte Hyperammonämie (oft 1000 µg/dl und mehr), erhöhte Transaminasenwerte, pH und Elektrolyte im Normbereich und Harnstoff im unteren bis mittleren Normbereich. Bei der Mehrheit der Patienten findet man eine unspezifische Hyperaminoazidämie und Aminoazidurie. Die Orotsäureausscheidung im Urin ist normal. Vereinzelt treten pulmonale oder gastrointestinale Blutungen auf.

Neben den in 1.3 besprochenen allgemeinen Therapiemöglichkeiten zur Senkung des Blutammoniakspiegels wird von einigen Autoren versucht, die (eventuell vorhandene) Restaktivität der CPS I durch Carbamylglutamat zu stimulieren (9,10,11).

Trotz aller therapeutischen Bemühungen überleben die wenigsten der vom kompletten CPS-I-Mangel betroffenen Patienten die Neonatalperiode.

Mit wesentlich geringer ausgeprägter Symptomatik präsentieren sich die Patienten mit partiellem CPS-I-Mangel.

Obwohl wenige von ihnen bereits in den ersten Lebenswochen erkranken, beginnen die hyperammonämischen Krisen typischerweise erst beim Umstellen von Muttermilch oder adaptierter Milch auf Kuhmilch (3).

Die Erscheinungen sind milder als beim kompletten Enzymmangel (Erbrechen, Fieber, Irritabilität, Lethargie) und sistieren meist auch ohne Therapie nach wenigen Tagen. Rezidivierende Krisen sind die Regel. Auf lange Sicht beobachtet man bei diesen Patienten eine Retardierung in der psychomotorischen Entwicklung.

Die gleiche Verteilung auf beide Geschlechter sowie die klinische Unauffälligkeit der Eltern der betroffenen Kinder belegen den autosomal-rezessiven Erbgang des CPS-I-Mangels.

1.2.2 Ornithintranscarbamylase-Mangel

Dieser häufigste Enzymdefekt des Harnstoffzyklus (3) wurde erstmals von Russell und Mitarbeitern 1962 (6) beschrieben.

Die auffälligen geschlechtsabhängigen Unterschiede in der klinischen Symptomatik - neonatale Hyperammonämie mit in der Regel letalem Ausgang bei betroffenen männlichen

Patienten, mildere Verläufe mit oft guter Prognose bei betroffenen weiblichen Patienten - ließen schon Levin et al. (12) an einen x-chromosomal-dominanten Erbgang denken. Dieser gilt heute als gesichert (13).

Der komplette OTC-Mangel der hemizygot erkrankten männlichen Patienten bedingt den dramatischen Verlauf: In den ersten Lebenstagen, manchmal sogar schon in den ersten Lebensstunden, verweigern die Säuglinge die Nahrungsaufnahme, trüben ein und sterben trotz therapeutischer Intensivmaßnahmen meist rasch.

Ein Überleben dieser ersten schweren Hyperammonämie wird vereinzelt beobachtet (14), dennoch ist eine letale metabolische Krise im weiteren Verlauf bisher unausbleiblich.

Neben den bereits beim CPS-Mangel (1.2.1) erwähnten unspezifischen Laborveränderungen zeigen OTC-Mangel-Patienten charakteristischerweise eine erhöhte Orotsäureausscheidung im Urin. Dies wird dadurch bedingt, daß das vor dem metabolischen Block anfallende mitochondriale Carbamylphosphat ins Zytosol übertritt und dort in die Pyrimidinsynthese einmündet (1.2.1), in der die Orotsäure ein Zwischenprodukt darstellt. Desweiteren liegt eine Hypocitrullinämie vor, die beim Neugeborenen bereits vor der hyperammonämischen Krise diagnostiziert werden kann.

Ungeklärt sind bisher einige "late-onset"-Fälle männlicher Individuen mit nachgewiesenem OTC-Mangel, bei denen die genannten Symptome nach komplikationsloser Neonatalphase und Säuglingsalter erst im Kleinkindalter auftreten.

Die heterozygoten Patientinnen erkranken in Abhängigkeit von der jeweiligen Restaktivität der OTC entweder im Neugeborenenalter, erst nach mehreren Jahren oder bleiben asymptomatisch (3). Episodenhaftes Erbrechen, Kopfschmerzen,

Lethargie und rezidivierende Krampfanfälle - oftmals durch Impfungen, Infektionen oder chirurgische Eingriffe ausgelöst - kennzeichnen den symptomatischen Verlauf. Beeinträchtigte körperlich-geistige Entwicklung ist dann zu erwarten.

Die meisten Patientinnen haben eine ausgeprägte Aversion gegen proteinreiche Nahrung, was der wichtigsten therapeutischen Maßnahme - Proteinrestriktion auf Minimalbedarf - entgegenkommt. Bei Einhaltung dieser Therapie kann eine normale Lebenserwartung erzielt werden, frühzeitige Todesfälle sind aber dennoch keine Seltenheit.

Eine nicht-invasive Möglichkeit, asymptotische Trägerinnen des OTC-Mangels zu diagnostizieren, stellt nach Goldstein et al. (15) der Ammonium-Belastungstest dar: oraler Verabreichung von NH_4Cl -Kapseln folgt eine signifikant erhöhte Orotsäureausscheidung im Urin bei Trägerinnen des Gendefekts. Ebenso kann ein Proteinbelastungstest durchgeführt werden.

Biopsien bzw. post-mortem Untersuchungen der hemizygoten Patienten sind oft gänzlich unauffällig, bei den "late-onset"-Fällen sowie bei den heterozygoten Patientinnen können zahlreiche unspezifische Veränderungen gefunden werden. Dies gilt auch für Patienten mit CPS-Mangel. Die für das Reye-Syndrom, einer wichtigen klinischen Differentialdiagnose des OTC-Mangels, charakteristischen mitochondrialen Läsionen fehlen (16).

Dilatierter Ventrikel, kortikale Atrophie und Astrozyten vom Alzheimer-Typ II kennzeichnen die hirnpathologischen Veränderungen (17).

1.2.3 Diagnose der Harnstoffzyklusenzymdefekte

Zur Diagnose von Enzymdefekten des Harnstoffzyklus führen verschiedene Wege.

Ist in einer Familie ein erblicher Enzymdefekt bereits bekannt, sollte bei allen Neugeborenen unmittelbar nach der Geburt eine Aminosäurenanalyse im Urin oder im Blut durchgeführt und der Ammoniakspiegel im Blut bestimmt werden. Bei verdächtigem Befund erfolgt die endgültige Diagnose durch Bestimmung der Enzymaktivität in einer Gewebebiopsie (i.d.R. der Leber).

Treten bei einem Kind die Symptome einer Hyperammonämie erstmals auf, so sollten diese den Arzt an einen Enzymdefekt im Harnstoffzyklus denken und diagnostische Schritte einleiten lassen. Auch hier steht am Beginn die Aminosäurenanalyse sowie eine Untersuchung des Urins auf seinen Orotsäuregehalt. Beim OTC-Mangel nämlich liegt keine Erhöhung des Carbamylphosphates im Blut vor, wie zu erwarten wäre, denn Carbamylphosphat ist eine äußerst instabile Aminosäure und daher selbst bei einem massiven Stoffwechselblock nicht vermehrt nachweisbar. Vielmehr ist eine stark erhöhte Orotsäureausscheidung im Urin der auffallendste Befund (1.2.2). Die Leberbiopsie dient wiederum der Diagnosesicherung.

Zur pränatalen Diagnostik siehe 5.3.

1.2.4 Abbauwege des Ammoniak bei Harnstoffzyklus- enzymdefekten

Freies Ammoniak ist für den menschlichen Organismus ein hochtoxisches Molekül.

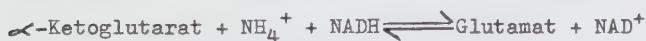
Kommt es aufgrund eines Enzymdefektes im Harnstoffzyklus zu einem metabolischen Block, führt dieser zu einem bedrohlichen Anstieg des Ammoniakspiegels im Blut.

Zwar genügt eine relativ kleine Enzymrestaktivität zur Aufrechterhaltung eines (sub-)normalen Harnstoffspiegels im Blut - die proximal des Blocks ansteigende Substratkonzentration bewirkt offenbar eine Enzyminduktion - ein Ansteigen des Ammoniaks kann dadurch jedoch nicht verhindert werden.

Können einzelne Enzyme des Harnstoffzyklus auch in anderen Organen nachgewiesen werden, zum Beispiel in Niere, Darm, Milz und Gehirn, so können diese aber die Syntheseleistung der Leber nicht annähernd erreichen und tragen deshalb wenn überhaupt nur unwesentlich zur Harnstoffproduktion bei.

Die direkte Ausscheidung des Ammoniaks in den Urin beträgt unter physiologischen Voraussetzungen ungefähr 5 - 10% der insgesamt anfallenden Menge (18). Diese Rate kann in hyperammonämischen Zuständen nicht ausreichend gesteigert werden.

Im Gehirn wird freies Ammoniak auf α -Ketoglutarat übertragen. Wird auf das entstandene Glutamat ein weiteres Ammoniakmolekül übertragen, entsteht Glutamin:



Da diese Reaktionen zwar Ammoniak entgiften können, diese Vorgänge aber auf Kosten von NADH, α -Ketoglutarat und ATP ablaufen, könnten sie laut Walser (3) durchaus die Neurotoxizität von Ammoniak mitbegründen. Überschüssiges Ammoniak kann also vom Organismus bei verminderter Harnstoffsynthese in der Leber nicht in effizienter Weise beseitigt werden.

1.3 Differentialdiagnose und Therapie der Hyperammonämie

Die Hyperammonämie ist eine medizinische Notfallsituation, die rasch erkannt und behandelt werden muß, um irreversible Organschäden (vor allem des ZNS) zu verhindern. Über die Differentialdiagnose im Kindesalter informiert Tabelle 1 (nach Bachmann und Colombo (20)).

Tab.1: Hyperammonämie im Kindesalter

- 1) Erbliche Defekte der Harnstoffzyklusenzyme
 - N-Acetylglutamatsynthetase-Mangel
 - Carbamylphosphatsynthetase-Mangel
 - Ornithintranscarbamylase-Mangel
 - Citrullinämie (Argininosuccinatsynthetase-Mangel)
 - Argininbernsteinsäurekrankheit (Argininosuccinase-Mangel)
 - Argininämie (Arginase-Mangel)
- 2) Störungen des Transports von Harnstoffzyklusmetaboliten
 - Lysinurische Proteinintoleranz
 - Hyperornithinämie-Homocitrullinämie-Hyperammonämie-Syndrom
- 3) Organische Azidurien
 - Isovalerianazidurie
 - Methylcrotonylglyzinurie
 - 3-Methyl-3-Hydroxyglutarazidurie
 - Propionazidurie
 - Methylmalonazidurie

4) Sekundäre oder unbekannte Ursachen

- Transiente Hyperammonämie des Frühgeborenen
- Reye's-Syndrom
- Gefäßmißbildungen (Shunt)
- Valproattherapie
- unspezifische Leberinsuffizienz

Eine schnelle Diagnosestellung ist wünschenswert, um eine differenzierte Therapie durchführen zu können. Die therapeutischen Ansatzpunkte sind

I) Verminderung der zirkulierenden Harnstoffvorstufen, vor allem des Ammoniaks

II) Verminderung der alimentären Proteinzufuhr

III) Stimulierung der Enzymrestaktivität (Tab.1, Punkt 1)

IV) Gabe von Natriumbenzoat

Ad I)

Prinzipiell stehen Austauschtransfusion, Peritoneal- und Hämodialyse zur Verfügung. Studien von Batshaw et al. und Donn et al. (21,22) zu Folge sind Peritonealdialyse und insbesondere die Hämodialyse der Blutaustauschtransfusion im akuten Fall (ein Überschreiten des Blut-ammoniakspegels von 300 $\mu\text{mol/l}$ bei einem Normwert von ca. 50 $\mu\text{mol/l}$) vorzuziehen. Letztere wirkt langsamer, weniger effektiv und ist kürzer andauernd.

Ad II)

Die Eiweißzufuhr ist auf den Minimalbedarf einzuschränken. Wird selbst dieser (etwa 1,5g Protein/kgKG beim Säugling) nicht vertragen, sollte auf die Zufuhr von essentiellen Aminosäuren oder gar deren α -Keto- oder α -Hydroxy-Analoga

umgestiegen werden (23).

Letzteres gilt jedoch nicht für Organische Azidurien als Ursache einer Hyperammonämie, weil bei diesen Patienten dadurch eine Ketoazidose hervorgerufen werden kann (24).

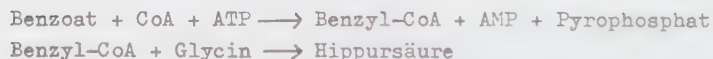
Ad III)

Im Tierversuch konnten Kim et al. (14) eine Stimulierung der CPS-Aktivität durch Verabreichung von N-Carbamylglutamat erzielen. Walser hält dies für eine mögliche Therapieform des partiellen CPS-Mangels (3).

Es gibt desweiteren Anhaltspunkte für die Stimulierbarkeit der CPS und OTC durch Glukagon sowie der CPS durch Kortikosteroide (25). Der erfolgreiche klinische Einsatz steht allerdings bisher noch aus.

Ad IV)

Dieser Weg der Stickstoffausscheidung durch Koppelung von Glycin an Natriumbenzoat als Therapieform der Hyperammonämie wurde von Brusilow, Valle und Batshaw 1979 aufgezeigt (26):



Das Produkt Hippursäure kann in großen Mengen über den Urin ausgeschieden werden. Prinzipiell erkannte schon Lewis 1914 einen Anstieg der Hippursäureausscheidung beim Menschen nach Ingestion von Benzoat (27).

In Konzentrationen von 200-500 mg/kgKG/Tag (28) kann so mit Hilfe von Benzoesäure der Blutammoniakspiegel in der akuten Krise rasch gesenkt werden. Verabreicht man zusätzlich Phenylacetat (125 mg/kgKG/Tag), kann der gewünschte Effekt durch beschleunigte Hippursäureausscheidung im Urin sogar noch verstärkt werden.

Dauertherapie mit Natriumbenzoat ist möglich, allerdings scheint es die Restaktivität der Enzyme zu beeinträchtigen und sollte deshalb nur mit Zurückhaltung bei Patienten mit partiellem CPS- oder OTC-Mangel eingesetzt werden.

Bei Patienten mit Organischer Azidurie ist Natriumbenzoat kontraindiziert (20).

1.4 Ziele der vorliegenden Studie

- Entwicklung einer sensitiven Meßmethode zur Bestimmung der Carbamylphosphatsynthetase und der Ornithintranscarbamylase in verschiedenen menschlichen Zellen und Geweben unter Verwendung von radioaktiv markierten Substraten
- Erstellen von Normwertbereichen für die genannten Enzyme in den gemessenen Zellen und Geweben
- Untersuchungen zur Enzymkinetik
- Durchführen von Enzymmessungen in Chorionzottenbiopsien mit dem Ziel, eine verbesserte Methode zur pränatalen Diagnose des Carbamylphosphatsynthetase-Mangel bzw. Ornithintranscarbamylase-Mangel vorstellen zu können.

2. MATERIAL

2.1 Blut- und Gewebeproben

Die Blutproben zur Gewinnung von Erythrozyten und Leukozyten stammen von Freunden und Verwandten des Autors, Mitarbeitern des Stoffwechsellabors des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Universität München sowie vom Autor selbst. Bei keinem der Probanden ist eine Stoffwechselstörung bekannt.

Leber- und Darmgewebe stammt aus dem Gerichtsmedizinischen Institut der Universität München. Es wurde durch Autopsie Personen (Lebensalter 22-78 Jahre) entnommen, die eines unnatürlichen Todes gestorben waren und an keiner Stoffwechselerkrankung gelitten hatten. Ergänzt wurde dieses Material durch fetales Gewebe (Interruption bei Anenzephalie) sowie durch Biopsien von Patienten des Kinderspitals, die aus verschiedenen Indikationsgründen entnommen wurden und hier als Kontrollen eingesetzt wurden.

Die Chorionzottenbiopsien wurden von der Klinik Dr.W.v. Weidenbach, München, zur Verfügung gestellt.

2.2 Chemikalien

Die radioaktiv markierten Testbestandteile (^{14}C)-Carbamyolphosphat und (^{32}P)-Adenosintriphosphat wurden von NEW ENGLAND NUCLEAR geliefert (Best.-Nr. NEC-610 bzw. NEG-002 H).

Der Standard-Szintillator "Quickszint 212" wurde von ZINSSER ANALYTIC bezogen.

Die Chemikalien Triethanolaminpuffer und Tris-Puffer sowie Ammoniumhydrogencarbonat wurden von der Firma MERCK bezogen.

Carbamylphosphat, Ornithin, Citrullin, ATP, Acetylglutamat, MgCl_2 und MgSO_4 wurden von der Firma SIGMA CHEMIE hergestellt.

3. DURCHFÜHRUNG

3.1 Probenvorbereitung

3.1.1 Erythrozytenpräparation

Heparinisiertes Vollblut wird zentrifugiert, das überstehende Plasma anschließend vorsichtig abgehoben und verworfen.

Die Erythrozyten werden nun mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, auf Eppendorfhütchen verteilt und bis zur Verwendung im Test bei -20°C aufbewahrt.

3.1.2 Leukozytenpräparation

5ml heparinisiertes Vollblut werden mit 1ml Leukozytenlösung (5g Dextran, 0.7g NaCl, 50mg Heparin in 100ml aqua dest.) versetzt, gemischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Der leukozytenhaltige Überstand wird vorsichtig abgehoben und zentrifugiert.

Das Leukozytensediment wird dann mit 150 μl 0.1% Essigsäure geschüttelt und sofort mit 0.7% NaCl gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation kann das Leukozytensediment im Eppendorfhütchen bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

Zum Gebrauch der Leukozyten im Test werden diese aufgetaut, mit 300 μl aqua dest. versetzt und sonifiziert.

3.1.3 Präparation der Gewebeproben

Die Gewebeproben werden sofort nach Erhalt tiefgefroren (-20°C) und erst zur Verwendung im Test aufgetaut.

Zum Test werden kleine Gewebestückchen abgewogen und mit entsprechenden Mengen aqua dest. (zur OTC-Bestimmung) bzw. Homogenisationspuffer (zur CPS-Bestimmung) versetzt und sonifiziert, damit die Gewebeproben in folgenden Konzentrationen vorliegen:

Lebergewebe: 1mg/ml
Dünndarmgewebe: 2-4mg/ml
Chorionzotten: 2-4mg/ml

3.2 Proteinbestimmung nach Lowry (28)

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Gewebeproben werden folgende Lösungen verwendet:

A = 2% Na_2CO_3 in 0.1M NaOH

B_a = 5.5g CuSO_4 in 100ml

B_b = 1.35g Seignettesalz in 100ml Na/K-Tartrat

Folin Ciocalteus Phenolreagenz

2% Na_2CO_3 (zur Verdünnung von Folin)

Rinderserumalbumin (in den Verdünnungen 0.025; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 1.0 mg Protein/ml), dient der späteren Erstellung einer Eichgerade

Vor jeder Messung werden frisch hergestellt:

B = 0.02 ml B_a + 0.2 ml B_b

$C = 5.0 \text{ ml A} + 0.1 \text{ ml B}$

Folin Ciocalteus Phenolreagenz + 2% Na_2CO_3
im Verhältnis 1:2

Procedere:

Jeweils 20 μl der Rinderserumalbuminverdünnungen und der zu bestimmenden Proteingemische werden mit 250 μl der Lösung C versetzt und 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend werden jeweils 25 μl des verdünnten Folin Ciocalteus Reagenz hinzugegeben.

Dieses Gemisch wird wiederum bei 25°C für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

Die Proben bzw. Eichverdünnungen werden dann im Extinktionsphotometer gemessen. Ein gleichbehandelter Ansatz mit Wasser dient als Leerwert.

Die Eichgerade erhält man, indem man die erhaltenen Extinktionswerte gegen die jeweilige Rinderserumalbuminkonzentration aufträgt. Aus dieser können nun die Proteinkonzentrationen der Proben anhand der bekannten Extinktionswerte abgelesen werden.

3.3 Bestimmung der Ornithintranscarbamylase

3.3.1 Testansatz

Die OTC katalysiert die Entstehung von Citrullin aus Carbamylphosphat und Ornithin.

Diese prinzipiell reversible Reaktion kann man durch Substratüberschuß in die gewünschte Richtung ablaufen lassen.

Fügt man der Reaktion radioaktiv markiertes Substrat, (14-C)-Carbamylphosphat, hinzu, so kann aus der Menge des entstandenen radioaktiven Produktes Citrullin die Aktivität der OTC ermittelt werden:



Die notwendige Trennung des radioaktiv markierten Produktes vom Substrat erfolgt mit Hilfe von DEAE-Zellulose-Säulen (3.3.2).

Folgende Lösungen werden benötigt:

- Carbamylphosphat, 50mM (Endkonzentration im Ansatz 5mM)
- Ornithin, 25mM (Endkonzentration im Ansatz 2.5mM)
- Triethanolamin (TEA)-Puffer, 270mM, pH 7.7
- Lyophilisiertes (14-C)-Carbamylphosphat, in aqua bi-dest gelöst (5×10^6 cpm/ml $\hat{=}$ 3 uCi/ml). Diese instabile Lösung muß für jeden Test frisch hergestellt werden.

Die benötigten Gewebeproben werden am Tage des Tests frisch sonifiziert. Das Homogenat wird zentrifugiert und anschließend der enzymhaltige Überstand abgehoben und dem Versuch zugeführt, die Zelltrümmer im Sediment werden verworfen.

Das Substrat-Puffer-Gemisch setzt sich zusammen aus

2 Teilen	(14-C)-Carbamylphosphat
1 Teil	Carbamylphosphat 50mM
1 Teil	Ornithin 25mM
1 Teil	TEA-Puffer 270mM

Jeweils 50 μ l dieses Gemisches werden mit 50 μ l Gewebemogenat vermischt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Der Reaktionsstop erfolgt durch einminütiges Erhitzen dieses Reaktionsgemisches auf 95°C.

Als Leerwert dient ein Reaktionsgemisch, bei dem Ornithin durch einen weiteren Teil TEA-Puffer ersetzt wird.

3.3.2 Trennung des Produktes vom Substrat

Das entstandene Produkt (14-C)-Citrullin soll vom Substrat (14-C)-Carbamylphosphat getrennt werden.

Dies geschieht mittels Ionenaustausch-Säulenchromatographie nach Shin et al. (29).

Das zugrundeliegende Prinzip ist dabei folgendes:

Die verwendete DEAE-Zellulose der Cl⁻-Form bindet - im Austausch mit den Cl⁻-Ionen - nach Reaktionsstop im Gemisch noch vorhandenes Carbamylphosphat.

Die nach diesem Eluierungsvorgang noch vorhandene Radioaktivität im Gemisch entspricht dann dem Produkt Citrullin.

Technisches Vorgehen:

Die als Säulen fungierenden handelsüblichen 2ml-Spritzen werden mit aqua dest. sorgfältig gesäubert und der Boden (= die Spitze der Spritze) mit einem Stück Glaswolle verstopft, welches die Zellulose zurückhält, für Flüssigkeiten jedoch durchgängig ist (Abb.2).

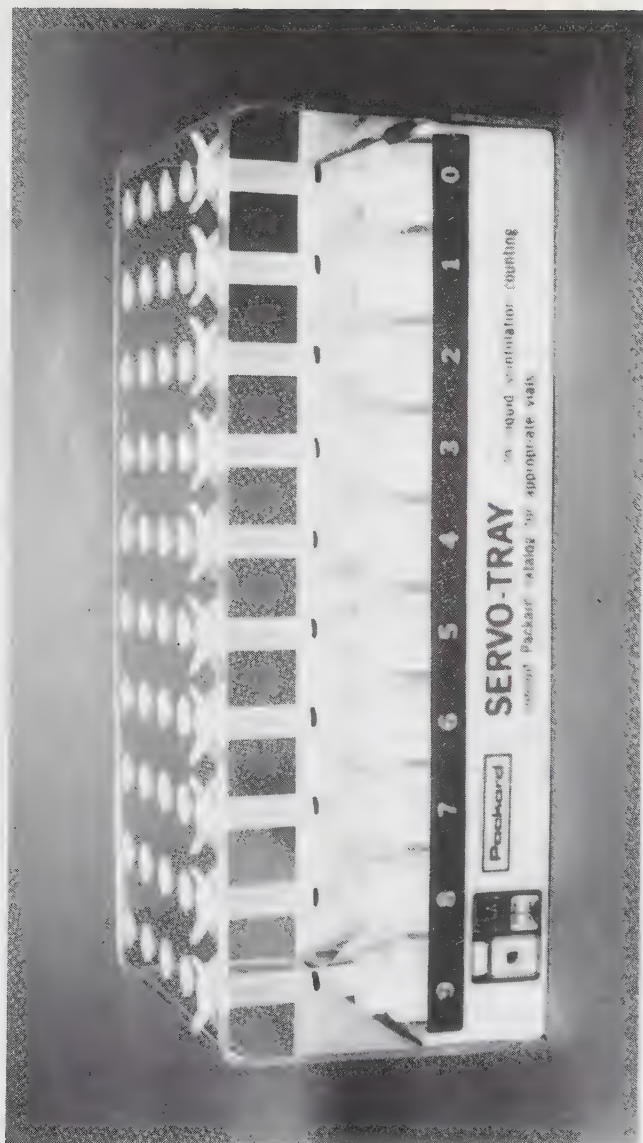


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Säulen mit Haltevorrichtung und Auffanggefäßen

Die Säulen werden auf eine Haltevorrichtung gegeben und bis zur 1ml-Markierung mit DEAE-Zellulose, Cl⁻-Form, gefüllt. Die Zellulose wird jetzt mit 3 x 1ml aqua dest. equilibriert.

Von jedem der 100ul-Reaktionsgemische des Testes werden 50 ul entnommen und auf jeweils eine der Säulen aufgetragen, die restlichen 50 ul werden zur Bestimmung des 100%-Bezugswertes gesammelt.

Anschließend Spülen der Säulen mit je 3 x 1ml aqua dest. und Auffangen des Eluates in Einmalgefäßen (= vials). Das gewonnene Eluat wird mit je 18 ml Quickszint versetzt, gut gemischt und in den Szintillationszähler zur quantitativen Bestimmung des radioaktiv markierten Citrullins gegeben.

Die gesammelten, nicht auf die Säulen aufgetragenen, restlichen 50 ul eines jeden Reaktionsgemisches werden ebenfalls mit 18 ml Quickszint vermischt. Sie enthalten die relative Gesamtradioaktivität und dienen daher als 100%-Bezugswerte.

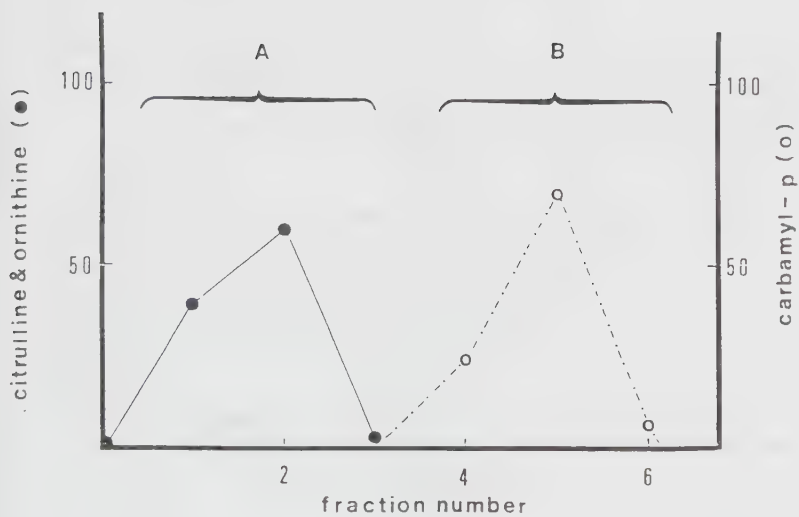
Das an die Zellulose gebundene, nicht verstoffwechselte (14-C)-Carbamylphosphat wird abschließend mit 150mM HCl eluiert und der Laborsammelstelle für radioaktiven Abfall zugeführt.

Die Eluationsverhältnisse veranschaulicht Abb. 3.

Die Kurven stellen den pro ml Spülflüssigkeit (A = aqua dest., B = 150mM HCl) eluierten relativen Teil der bezeichneten Substanzen in % dar.

Die Fraktionsnummern entsprechen fortlaufenden ml.

Abb. 3 Eluierung von Citrullin und CP
mit aqua dest. bzw. 150mM HCl



3.3.3 Berechnung der Enzymaktivität

Die Berechnung der Aktivität der OTC erfolgt nach der Formel

$$\Delta \text{cpm} \times \text{mM CP} \times \text{Teile CP} \times \text{Vol. des Gemisches}$$

$$100\% \text{ cpm} \times \text{Teile gesamt} \times \text{min.} \times \text{Vol.d.Probe} \times \text{mgProt./ml}$$

wobei die Ausgangskonzentration des Carbamylphosphates 50mM ist, Carbamylphosphat 1 von 5 Teilen ist und das Volumen des Gemisches dem der Probe entspricht (50 μ l). Die Reaktionszeit beträgt 30 Minuten.

Vereinfacht ergibt sich daher folgende Formel:

$$\frac{\Delta \text{cpm}}{100\% \text{ cpm}} \times 50\text{mM} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{30 \text{ min.}} \times \frac{1}{\text{mg Prot./ml}}$$

Der erhaltene Wert ergibt die Enzymaktivität der OTC in $\mu\text{mol/min/mg Protein ml}^{-1}$ bzw. nach Multiplikation mit dem Faktor 1000 in $\text{nmol/min/mg Protein ml}^{-1}$.

3.3.4 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der Kinetik der OTC wurden verschiedene Testansätze mit jeweils variablen Konzentrationen des einen Substrats bei konstanter Konzentration des anderen Substrats durchgeführt.

Mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Diagrammen können dann die Michaelis-Menten-Konstanten abgelesen werden (4.1.4).

Testkonzentrationen zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Ornithin:

Carbamylphosphat: 5mM (konstant)

Ornithin: 0,1mM
0,3mM
0,5mM
1,0mM
2,5mM

Testkonzentration zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Carbamylphosphat:

Ornithin: 2,5mM (konstant)

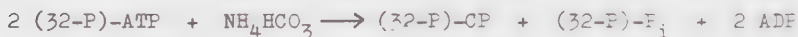
Carbamylphosphat: 0,075mM
0,10mM
0,15mM
0,20mM
0,40mM

Die Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen im Ansatz.

3.4 Bestimmung der Carbamylphosphatsynthetase I

Die CPS I katalysiert die Synthese von Carbamylphosphat aus NH_4 und HCO_3 in Anwesenheit der Kofaktoren Acetylglutamat und MgCl_2 unter Verbrauch von ATP.

Fügt man der Reaktion im Test (32-P)-Adenosintriphosphat hinzu, so kann aus der Menge des entstandenen radioaktiven Carbamylphosphats die Aktivität der CPS I errechnet werden:



Die Substrate liegen wiederum im Überschuß vor, so daß die Reaktion in die gewünschte Richtung abläuft.

Zur Trennung von Produkt und Substrat werden analog zur Bestimmung der OTC wieder DEAE-Zellulose-Säulen verwendet.

3.4.1 Testansatz

Für den Reaktionsablauf werden folgende Lösungen benötigt:

- NH_4HCO_3 , 100mM (Endkonzentration im Ansatz: 10mM)
- ATP, 10mM (Endkonzentration im Ansatz: 1mM)
- Acetylglutamat, 50mM (Endkonzentration im Ansatz: 5mM)
- MgCl_2 , 100mM (Endkonzentration im Ansatz: 10mM)

Diese Lösungen können in größeren Mengen hergestellt, eingefroren und zum Test aufgetaut werden.

- (32-P)-ATP , wird in der Konzentration von 5mCi/ml in wässriger Lösung geliefert und für den Test auf etwa 2000 cpm/ul verdünnt.

Es empfiehlt sich aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 14 Tagen die radioaktive Substanz (32-P -ATP erst unmittelbar, d.h. 2 - 3 Tage, vor dem Einsatz im Test zu bestellen.

Die verwendeten Gewebsproben werden - wie auch bei der Messung der OTC - immer frisch sonifiziert und der Überstand nach Zentrifugieren dem Test zugeführt. Zum Sonifizieren verwendet man einen Puffer, der sich aus 10mM MgSO_4 und 100mM Tris-Puffer (pH 7.5) zusammensetzt.

Das Substratgemisch besteht aus

3 Teilen	(32-P)-ATP
1 Teil	ATP 10mM
1 Teil	NH_4HCO_3 100mM
1 Teil	Acetylglutamat 50mM
1 Teil	MgCl_2 100mM

Als Leerwert dient ein Substratgemisch, bei dem NH_4HCO_3 durch aqua dest. ersetzt wird.

70 ul des o.g. Gemisches werden mit 30 ul Gewebehomogenat vermischt und bei 32°C inkubiert. Durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C wird die Reaktion nach 30 Minuten gestoppt.

3.4.2 Trennung des Produktes vom Substrat

Zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität muß das radioaktiv markierte Substrat, (32-P)-ATP vom Produkt, (32-P)-Carbamyolphosphat, getrennt werden.

Die Säulenvorbereitung geschieht wie bereits in 3.3.2 geschildert.

Es wird ebenfalls DEAE-Zellulose der Cl^- -Form verwendet. Das Equilibrieren erfolgt mit 3 x 1ml HCl 15mM.

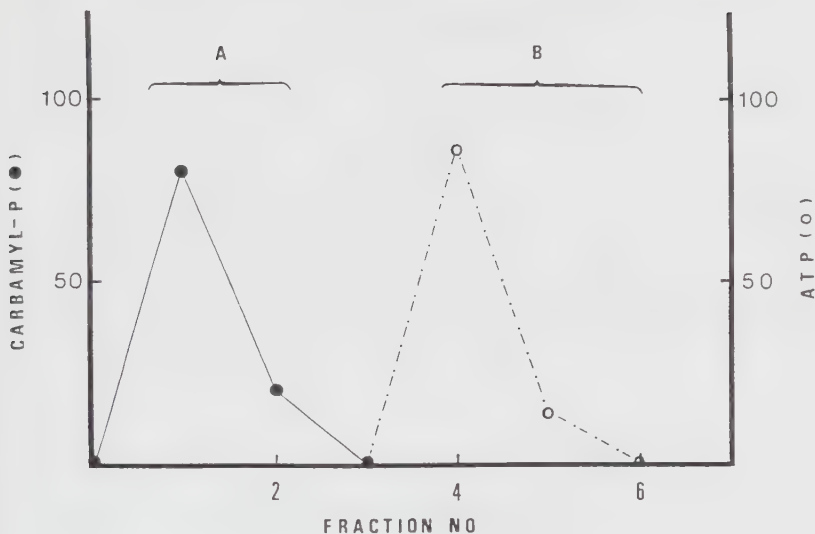
50 der 100 μl Reaktionsgemisch werden auf jeweils eine Säule aufgetragen, die restlichen 50 μl für die Bestimmung des 100%-Bezugswertes gesammelt.

Das radioaktive Produkt Carbamyolphosphat wird durch zweimaliges Eluieren mit je 3 x 1ml HCl 15mM in vials aufgefangen, mit 18 ml Quickszint vermischt und im Szintillationszähler gemessen. Das Eluat enthält auch das markierte P_i . Da aus 2 Molekülen (32-P)-ATP je 1 Molekül (32-P)-CP und (32-P)- P_i entstehen und letztere zusammen im Eluat erscheinen, ist keine Korrektur der gemessenen cpm-Werte nötig.

Mit 150mM HCl wird abschließend das noch an die Zellulose gebundene (32-P)-ATP eluiert und der Entsorgungsstelle zugeführt.

Abb. 4 zeigt die Eluationsverhältnisse: Die Fraktionsnummern entsprechen jeweils 2ml, A = 15mM HCl, B = 150mM HCl.

Abb.4: Eluierung von CP und ATP mit 15mM HCl bzw. 150mM HCl



3.4.3 Berechnung der Enzymaktivität

Zur Berechnung der Aktivität der CPS I wird folgende Formel angewendet:

$$\Delta \text{cpm} \times \text{mM ATP} \times \text{Teile ATP} \times \text{Vol.d.Gemisches}$$

$$100\% \text{ cpm} \times \text{Teile gesamt} \times \text{min} \times \text{Vol.d.Probe} \times \text{mg Prot/ml}$$

Δcpm entspricht hierbei der Summe der cpm-Werte des 1. und 2. Probeneluates abzüglich der Summe des 1. und 2. Leerwerteluates.

Die Ausgangskonzentration des ATP beträgt 10mM, der Anteil des nicht markierten ATP am Substratgemisch ist 1/7, das Volumen des Gemisches beträgt 70 ul, das der Probe 30 ul, die Reaktionszeit ist 30 Minuten.

Somit ergibt sich die Formel:

$$\frac{\text{cpm}}{100\% \text{ cpm}} \times 10\text{mM} \times \frac{1}{7} \times \frac{1}{30 \text{ min}} \times \frac{70 \text{ ul}}{30 \text{ ul}} \times \frac{1}{\text{mg Prot/ml}}$$

Wird der erhaltene Zahlenwert mit dem Faktor 1000 multipliziert, so ergibt sich die Enzymaktivität der CPS I in nmol Substratumsatz/min/mg Protein ml⁻¹.

3.4.4 Enzymkinetik

Analog zur Bestimmung der Kinetik der OTC (3.3.4) wurden auch für Messungen zur Kinetik der CPS verschiedene Testansätze durchgeführt:

Testkonzentrationen zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für ATP:

NH₄HCO₃: 10mM (konstant)

ATP: 0,33mM
0,50mM
1,00mM
2,00mM

Testkonzentrationen zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für NH_4HCO_3 :

ATP: 1mM (konstant)

NH_4HCO_3 : 2,5mM
5,0mM
10mM
20mM

Die Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen im Ansatz.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ornithintranscarbamylase-Messung

4.1.1 Protein- und Zeitabhängigkeit

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, zeigt die Aktivität der OTC bei Verwendung von Leberhomogenat der Konzentration 0.2 mg Protein/ml eine lineare Zunahme im Verhältnis zur Zeit (10, 20 und 30 Minuten).

Abb.5: Zeitabhängigkeit der OTC-Aktivität

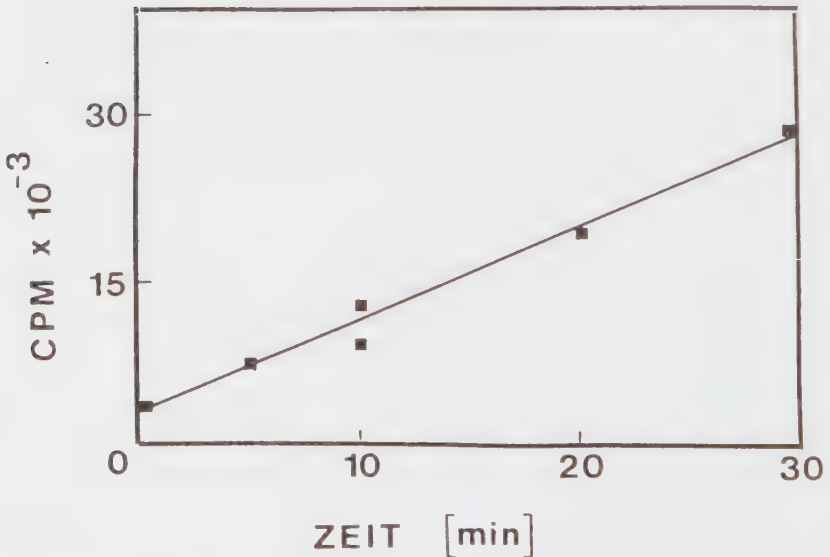
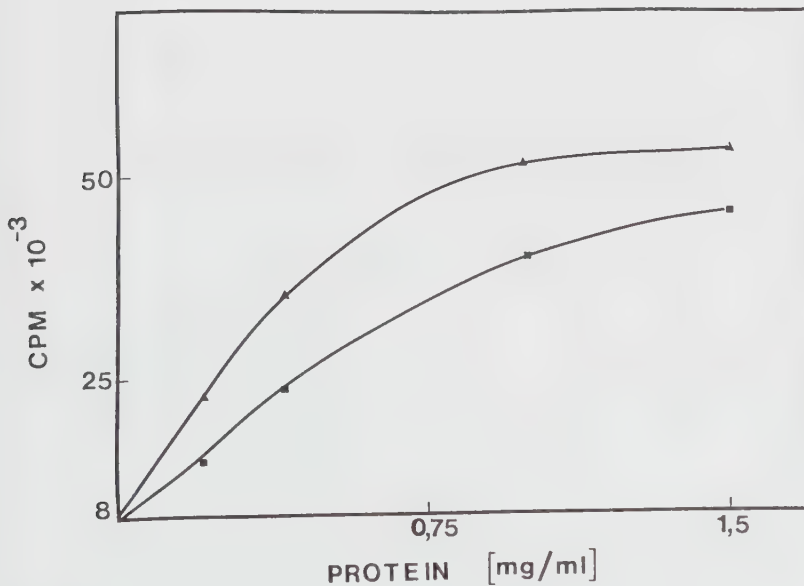


Abbildung 6 verdeutlicht, daß die optimale Protein-
konzentration der Proben für die Messung der OTC im
Bereich von 0.2 mg Protein/ml liegt.

Abb.6: Proteinabhängigkeit der OTC-Aktivität



■ : Inkubationszeit 10 min

▲ : Inkubationszeit 20 min

4.1.2 Ornithintranscarbamylase in Erythrozyten

Die Erythrozytenproben werden mit aqua dest. 1:3 verdünnt. Je 50 ul dieses Hämolysates entsprechen einer Probe im Test.

Als Leerwerte dienen Proben, die mit dem Substratgemisch eine Minute auf 95 °C erhitzt werden und dann auf die Säulen gelangen.

Die Messergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab.2: OTC-Aktivität in Erythrozyten

- a = Substratgemisch mit Ornithin
b = Substratgemisch mit aqua dest. statt Ornithin
c = Substratgemisch vorgeheizt

<u>Probe</u>	<u>Substratgemisch</u>	<u>OTC</u>
F.T.	a	18436 / 18964
F.T.	b	15428 / 19096
F.T.	c	6709
E.H.	a	15642 / 15840
E.H.	b	17139 / 18049
E.H.	c	6493 / 6489

100%-Bezugswert: 130000 - 135000

4.1.3 Ornithintranscarbamylase in Gewebeproben

Zunächst wurde mit einer Leberprobe folgender Test durchgeführt:

Zwei verschiedene Substratgemische werden verglichen.

Das eine (a) enthält Ornithin in einer Endkonzentration von 2.5mM, das andere (b) stattdessen aqua dest.

Den Leerwert für diesen Test erhält man, indem ein Reaktionsgemisch 1 Minute lang bei 95°C denaturiert und anschließend auf die Säulen gegeben wird.

Die Messergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab:3: Vergleichender Leerwerttest

- a = Substratgemisch mit Ornithin
- b = Substratgemisch ohne Ornithin

<u>Probe</u>	<u>Substratgemisch</u>	<u>cpm</u>
Leber 120	leer (a)	25561 / 26267
Leber 120	Probe (a)	130915 / 133519
Leber 120	leer (b)	1999 / 4973
Leber 120	Probe (b)	9484 / 9467

100%-Bezugswert: 190000 - 195000

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Tests nicht ein einminütig vorgeheizter Leerwert verwendet (cpm ~ 25000), sondern ein Substratgemisch, bei dem das Substrat Ornithin durch einen weiteren Teil TEA-Puffer ersetzt wird (cpm ~ 9500).

Die Tabellen 4,5,6 zeigen zusammenfassend die in Leber-, Dünndarm- und Chorionzottenproben gemessenen OTC-Aktivitäten.

Es handelt sich dabei um frische Proben, die entweder sofort nach Erhalt gemessen wurden oder am Tage des Testes aufgetaut, sonifiziert und eingesetzt wurden.

Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren eines bereits sonifizierten Leberhomogenates hat einen deutlichen Aktivitätsverlust zur Folge (Abb.7).

Eine für mindestens 1 Jahr bei -30°C gelagerte Probe (Leberprobe 6, Tab.4) zeigt ebenfalls einen erheblichen Aktivitätsverlust.

Abb.7: Abnahme der OTC-Aktivität in Lebergewebe in Relation zur Zeit

■ = Lebergewebe 1

▲ = Lebergewebe 2

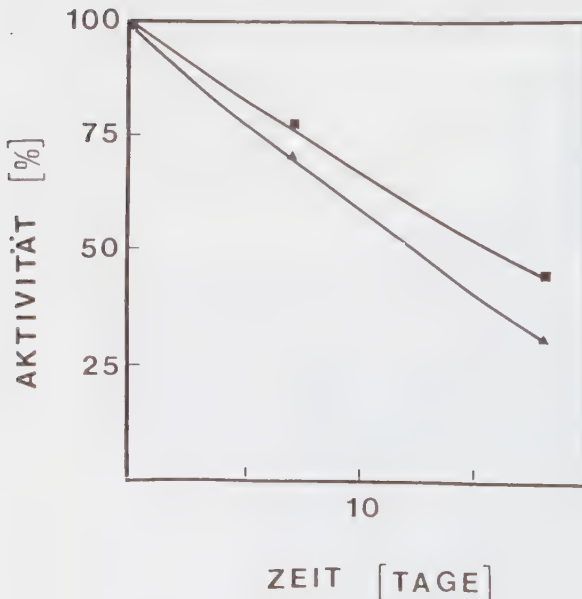


Tabelle 4

OTC-Aktivität in Leberproben

(Aktivität in nmol Substratumsatz/min/mg Protein)

<u>Probe</u>	<u>Aktivität</u>
Leber 1	1207
Leber 2	1236
Leber 3	2785
Leber 4	2423
Leber 5	527
Leber 6 (alt)	261
Mittelwert (Proben 1-5):	1635,6 ± 838
Leber 7 (fetal; 26. SSW ⁺)	823
Leber 8 (fetal; 20. SSW)	777
Leber 9 (fetal; 24. SSW)	795
Leber 10 (fetal; 20. SSW)	664
Mittelwert (Proben 7-10):	764,8 ± 60,4

+) = Schwangerschaftswoche

Tabelle 5

OTC-Aktivität in Dünndarmproben
(Aktivität in nmol Substratumsatz/min/mg Protein)

<u>Probe</u>	<u>Aktivität</u>
Jejunum 1	98,1
Jejunum 2	87,4
Jejunum 3	105
Jejunum 4	127,5
Jejunum 5	143,9
Jejunum 6	31
Jejunum 7	33,6
Jejunum 8	32,2
<u>Mittelwert:</u>	<u>82,3 ± 42,0</u>
Duodenum 1 (fetal; 26.SSW ⁺)	15,0
Duodenum 2 (fetal; 20.SSW)	14,3
Duodenum 3 (fetal; 24.SSW)	8,9
Duodenum 4 (fetal; 20.SSW)	10,0
<u>Mittelwert:</u>	<u>12,05 ± 2,6</u>

+) = Schwangerschaftswoche

Tabelle 6

OTC-Aktivität in Chorionzotten
(Aktivität in nmol Substratumsatz/min/mg Protein)

<u>Probe</u>	<u>SSW</u> ⁺⁾	<u>Aktivität</u>
Chorionzotten 1	8	1,8
Chorionzotten 2	8	1,9
Chorionzotten 3	?	4,3
Chorionzotten 4	8	4,1
Chorionzotten 5	13	6,5
Chorionzotten 6	8	5,5
Chorionzotten 7	13	7,7
Chorionzotten 8	9	6,7
Chorionzotten 9	8	2,7
Chorionzotten 10	8	6,3
Chorionzotten 11	9	6,3
Chorionzotten 12	9	6,7
Chorionzotten 13	7	2,9
Chorionzotten 14	9	5,9
Chorionzotten 15	9	3,3
Chorionzotten 16	7	4,6

+) Schwangerschaftswoche

Forts. Tab.6

(Probe)	(SSW)	(Aktivität)
Chorionzotten 17	10	12,4
Chorionzotten 18	8	6,5
Chorionzotten 19	9	11,4
Chorionzotten 20	8	11,5
Chorionzotten 21	7	10,5
Chorionzotten 22	9	6,4
Chorionzotten 23	8	1,3
Chorionzotten 24	10	3,7
Chorionzotten 25	9/10	8,3
Chorionzotten 26	7	2,9
Chorionzotten 27	8	1,9
Chorionzotten 28	10	2,5
Chorionzotten 29	8	5,6

Mittelwert: 5,6 $\pm$ 3,0

4.1.4 Enzymkinetik

Die Kinetik der OTC veranschaulichen die Lineweaver-Burk-Diagramme für Ornithin (Abb.8) und Carbamylphosphat (Abb.9) bei unterschiedlich hohem Substratangebot.

Die entsprechenden Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) und maximalen Substratumsatzgeschwindigkeiten (v_{max}) sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefaßt.

Tab.7: Enzymkinetik der OTC / Substrat: Ornithin

Gewebe	v_{max} +)	K_m ++)
=====		
Leber 1	1111	0,65
Leber 2	714	0,5
Jejunum 1	77	0,55
"Darm"	50	0,55
Chorionzotten 1	43	0,3

+) nmol Substratumsatz/min/mg Protein

++) mmol/l

Tab.8: Enzymkinetik der OTC / Substrat: Carbamylphosphat

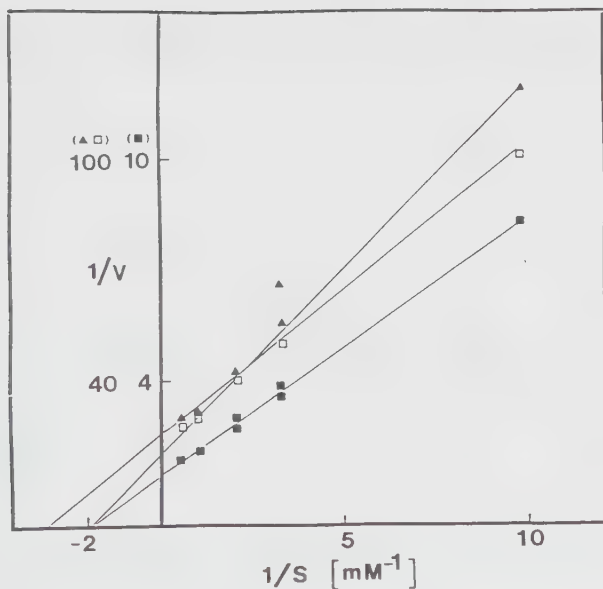
Gewebe	$v_{\max}$ +)	k_m ++)
=====		
Leber 1	363	0,4
Leber 2	526	0,4
Leber 3	513	0,33
Jejunum 1	10,0	0,33
Jejunum 2	8,7	0,3
Chorionzotten 1	2,5	0,33
Chorionzotten 2	5,3	0,15

+) nmol Substratumsatz/min/mg Protein

++) mmol/l

Abb.8: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Ornithintranscarbamylase in den Geweben Leber, Dünndarm und Chorionzotten

Substrat: Ornithin

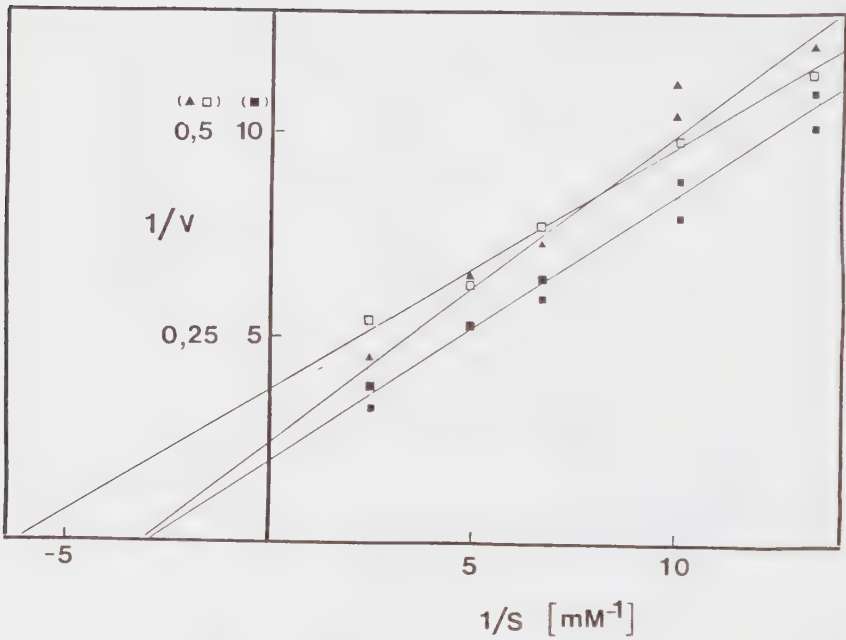


■ : Leber ▲ : Jejunum □ : Chorionzotten

V = $\mu\text{mol Substratumsatz/min/mg Protein}$

Abb.9: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Ornithintranscarbamylase in den Geweben Leber, Dünndarm und Chorionzotten.

Substrat: Carbamylphosphat



■ : Leber ▲ : Jejunum □ : Chorionzotten

▲ □ : $V = \text{nmol Substratumsatz/min/mg Protein}$
■ : $V = \mu\text{mol Substratumsatz/min/mg Protein}$

4.2 Carbamylphosphatsynthetase-I-Messung

4.2.1 Carbamylphosphatsynthetase I in Gewebeproben

Die in Leber- und Dünndarmgewebe sowie in Chorionzotten gemessenen CPS-I-Enzymaktivitäten sind in den Tabellen 9,10,11 zusammenfassend dargestellt.

Wie auch bei den OTC-Messungen handelt es sich um Proben, die sofort nach Entnahme, Transport und Erhalt gemessen wurden oder für den Test aufgetaut, sonifiziert und eingesetzt wurden.

Tabelle 9

CPS-I-Aktivität in Leberproben

(Aktivität in nmol Substratumsatz/min/mg Protein)

<u>Probe</u>	<u>Aktivität</u>
Leber 1	2,9
Leber 2	1,7
Leber 3	2,5
Leber 4	3,1
Leber 5	2,3
Leber 6	4,3
Leber 7	5,0

Forts. Tab.9

(Probe)	(Aktivität)
Leber 8	8,4
Leber 9	6,0
Leber 10	4,2
Leber 11	1,9
Leber 12	7,6

Mittelwert: 4,16 $\pm$ 2,1

Leber 13 (fetal; 24. SSW ⁺)	4,2
Leber 14 (fetal; 20. SSW)	4,7
Leber 15 (fetal; 26. SSW)	7,1
Leber 16 (fetal; 20. SSW)	3,4
Leber 17 (fetal; 22. SSW)	2,6
Leber 18 (fetal; 26. SSW)	6,3

Mittelwert: 4,7 $\pm$ 1,6

+) = Schwangerschaftswoche

Tabelle 10

CPS-I-Aktivität in Dünndarmproben

(Aktivität in nmol Substratumsatz/min/mg Protein)

<u>Probe</u>	<u>Aktivität</u>
Jejunum 1	2,6
Jejunum 2	1,8
Jejunum 3	1,1
Jejunum 4	1,4
Jejunum 5	2,3

Mittelwert: 1,84 ± 0,62

Duodenum 1 (fetal; 26. SSW ⁺)	2,0
Duodenum 2 (fetal; 20. SSW)	4,2
Duodenum 3 (fetal; 24. SSW)	3,7
Duodenum 4 (fetal; 20. SSW)	2,3

Mittelwert: 3,05 ± 0,92

+) = Schwangerschaftswoche

Tabelle 11

CPS-I-Aktivität in Chorionzotten

(Aktivität in nmol Substratumsatz/min/mg Protein)

<u>Probe</u>	<u>SSW</u> ⁺⁾	<u>Aktivität</u>
Chorionzotten 1	8	2,5
Chorionzotten 2	8	3,3
Chorionzotten 3	7	1,2
Chorionzotten 4	8	2,0
Chorionzotten 5	13	5,5
Chorionzotten 6	8	7,7
Chorionzotten 7	13	6,7
Chorionzotten 8	9	3,8
Chorionzotten 9	8	3,2
Chorionzotten 10	8	3,6
Chorionzotten 11	9	6,7
Chorionzotten 12	9	3,6
Chorionzotten 13	7	6,1
Chorionzotten 14	9	5,4
Chorionzotten 15	9	2,0
Chorionzotten 16	7	3,8
Chorionzotten 17	10	4,3

Mittelwert: 4,2 ± 1,8

⁺⁾ Schwangerschaftswoche

4.2.2 Enzymkinetik

Trägt man die Substratumsatzgeschwindigkeiten gegen entsprechende Substratkonzentrationen reziprok auf, so kann man diesem Lineweaver-Burk-Diagramm die Michaelis-Menten-Konstante (k_m) des betreffenden Substrates entnehmen. Sie ist der Kehrwert des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse im Negativen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Tabellen 12 (für ATP als variables Substrat) und 13 (NH_4HCO_3 als variables Substrat) aufgeführt, die Abbildungen 10 und 11 zeigen die dazugehörigen Lineweaver-Burk-Diagramme.

Tab.12: Enzymkinetik der CPS-I / Substrat: ATP

Gewebe	$v_{\max}$ +)	k_m ++)
=====		
Leber 1	10	1,7
Leber 2	6,3	1,7
Jejunum 1	67	2,0
Jejunum 2	20	2,0
Chorionzotten 1	40	2,0
Chorionzotten 2	16	2,5

+) nmol Substratumsatz/min/mg Protein

++) mmol/l

Tab.13: Enzymkinetik der CPS I / Substrat NH_4HCO_3

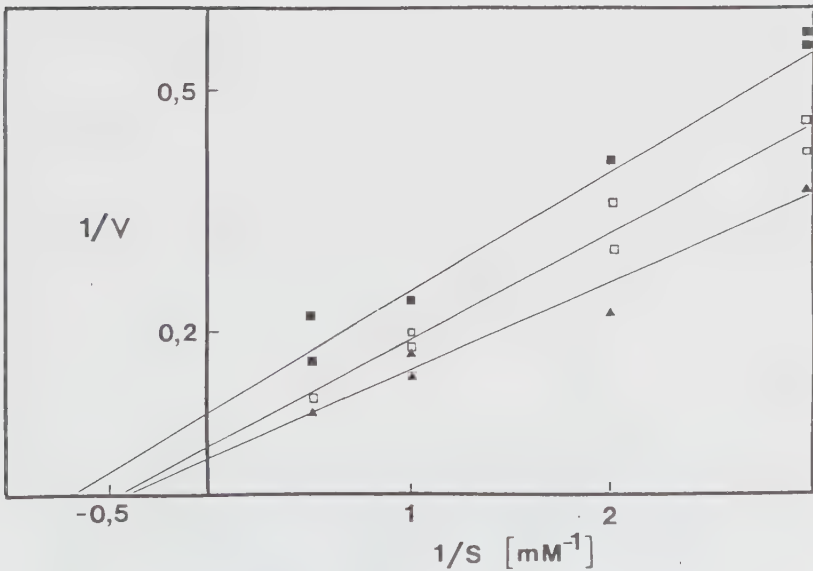
Gewebe	v_{max} +)	k_m ++)
=====		
Leber 1	9,1	5
Jejunum 1	3,7	1,8
Jejunum 2	2,5	5
Chorionzotten 1	7,2	5,9
Chorionzotten 2	13,2	8

+) nmol Substratumsatz/min/mg Protein

++) mmol/l

Abb.10: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Carbamylphosphatsynthetase I in den Geweben Leber, Dünndarm und Chorionzotten

Substrat: ATP

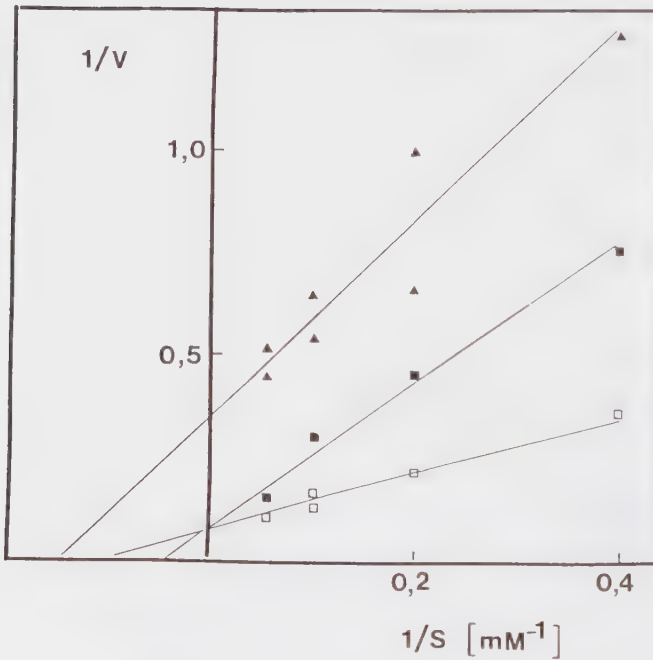


■ : Leber ▲ : Jejunum □ : Chorionzotten

V = nmol Substratumsatz/min/mg Protein

Abb.11: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Carbamylphosphatsynthetase I in den Geweben Leber, Dünndarm und Chorionzotten

Substrat: NH_4HCO_3



■ : Leber ▲ : Jejunum □ : Chorionzotten

V = nmol Substratumsatz/min/mg Protein

5. DISKUSSION

5.1 Methode

Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe von radioaktiven Substraten und Zellulose-Ionenaustausch-Minisäulen eine sensitive Methode zur Messung der Harnstoffzyklus-enzyme OTC und CPS I zu entwickeln.

Die von den Autoren in der Literatur genannten Methoden bisher gehen im Prinzip auf Archibald (30) zurück, der 1944 einen Versuchsablauf vorstellte, bei dem das Produkt eines Schrittes des Harnstoffzyklus durch Zufuhr weiterer Enzyme und Substrate letztendlich in Harnstoff verwandelt und dieser quantitativ bestimmt wurde. Somit konnte indirekt die Aktivität des gewünschten Enzyms ermittelt werden. Modifiziert wurde diese Methode dann von Brown und Cohen (31) sowie später von Snodgrass (32), welcher die Aminosäuren nach Versuchsablauf mittels Säulenchromatographie trennte und dadurch auf die weiteren Stoffwechselschritte bis zum Harnstoff verzichten konnte.

Die in dieser Studie verwendete Trennung der Produkte von den Substraten mit Hilfe von Ionenaustausch-Minisäulen wurde in unserem Labor von Shin entwickelt und stellt eine einfache, zuverlässige und leicht durchführbare Trennmethode dar. Geringste Gewebemengen (50 µg Leber, 100-200 µg Dünndarm bzw. Chorionzotten) genügen zur erfolgreichen Durchführung des Tests.

Die Verwendung von radioaktiv markierten Substraten, (^{14}C)-Carbamylphosphat bzw. (^{32}P)-Adenosintriphosphat, ist ein elegantes Vorgehen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, welches bei Untersuchungen zum Harnstoffzyklus

in ähnlicher Weise auch schon von anderen Autoren (15, 33,34,35,36) angewendet wurde. Zur notwendigen Trennung von Substrat und Produkt benutzten sie dann jedoch die aufwendigeren photo- und colorimetrischen (31) Verfahren.

Die in der vorliegenden Studie zunächst durchgeführten Untersuchungen mit Erythrozyten zeigten eine vermeintliche OTC-Aktivität bei Verwendung von vorgeheizten Leerwerten. Untersuchungen zur Kinetik ergaben gute Ergebnisse für variable Substratkonzentrationen des Carbamylphosphat, jedoch selbst bei mehrfacher Wiederholung keine verwertbaren Resultate für Ornithin. Dies rief den Verdacht hervor, daß das Carbamylphosphat mit endogenem Aspartat der Erythrozyten zu Aspartat-carbamylphosphat reagierte und das im Reaktionsgemisch vorhandene Ornithin nicht verstoffwechselt wurde. Ein daraufhin durchgeführter Test (4.1.2) ergab bei Verwendung von Reaktionsgemisch mit und ohne Ornithin in etwa gleich hohe cpm-Werte und bestätigte diese Vermutung.

Ein unter gleichen Voraussetzungen durchgeführter Test mit Lebergewebe (4.1.3) ergab:

Vorgeheizter Leerwert mit Ornithin: 25000 cpm

Probe mit Ornithin: 130000 cpm

Leerwert (Substratgemisch ohne Ornithin): 9500 cpm

Leerwert (Substratgem. ohne Ornithin + vorgeheizt): 2000 bzw.
5000

In allen weiteren Versuchen wurde deshalb als Leerwert ein Substratgemisch ohne Ornithin verwendet. Auf Vorheizen wurde verzichtet, weil dadurch fälschlicherweise nicht nur die OTC hitzedenaturiert werden würde, sondern auch das Enzym

Aspartattranscarbamylase. Es ergäbe sich ein zu niedriger Leerwert, weil in den gemessenen Proben entstandenes Aspartatcarbamylphosphat beinhaltet ist. Durch die Verwendung von Leerwerten ohne Ornithin und Verzicht auf Vorheizen wird dieser Fehler eliminiert und die cpm-Differenzwerte spiegeln lediglich das gewünschte Citrullin wider.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Ornithintranscarbamylase-Messung

Die von uns ermittelten Normwerte der OTC-Aktivität in adultem Lebergewebe liegen im Bereich von 527 bis 2785 nmol Substratumsatz/min/mg Protein (Mittelwert: $1635,6 \pm 838$). Sie sind damit zum Teil deutlich über den Literaturangaben verschiedener Autoren (2,9,37,38, 39,40,41,42,43,44,45), deren Referenzwerte von 6,2 bis 95 umol Substratumsatz/Stunde/mg Protein (= 103 - 1583 nmol Substratumsatz/min/mg Protein) variieren.

Für fetales Lebergewebe (etwa der 20. bis 26. Schwangerschaftswoche) konnten in dieser Studie Werte von 664 bis 823 nmol Substratumsatz/min/mg Protein (Mittelwert: $764,8 \pm 60,4$) gemessen werden. Das entspricht bereits 40 - 50 % der postnatalen Aktivität.

Räihä gibt für die pränatale OTC-Aktivität Werte von 10 % (8. SSW) bis 25 % (16. bis 20. SSW) [nach 18], Rodeck et al. (46) fanden fetal (18. bis 20. SSW) 60 bis 263 nmol Substratumsatz/min/mg Protein, was in etwa 20 - 50 % der von ihnen gefundenen postnatalen Aktivität (333 - 533) sind.

Für Dünndarmgewebe liegen nur wenige, sehr unterschiedliche Vergleichswerte vor.

Der in dieser Studie ermittelte Normbereich liegt zwischen 31 und 143,9 nmol Substratumsatz/min/mg Protein (Mittelwert: $82,3 \pm 42,0$). Das entspricht lediglich 5 % der Enzymaktivität der OTC in Lebergewebe.

Exakt dieselbe Prozentzahl gibt auch Walser an (3). Sie ist gleichzeitig die höchste aller extrahepatischen Organe.

Hoogenrad et al. (47) konnten eine Aktivität von $100,2 \pm 17,3$ nmol Substratumsatz/min/mg Protein in Dünndarmgewebe messen, was sehr gut mit unseren Werten übereinstimmt, jedoch fanden sie in Leberproben Aktivität in derselben Größenordnung ($106,3 \pm 13,4$ nmol Substratumsatz/min/mg Protein). Dies würde bedeuten, daß ihren Messungen zu Folge die OTC in Dünndarmmukosa ebenso aktiv wie in den Hepatozyten wäre. Dies konnte von keinem Autoren bisher nachvollzogen werden.

Die vielzitierte Studie von Jones et al. (48) weist in Rattendarmmukosa eine OTC-Aktivität von 100 umol Substratumsatz/hr/g wet weight tissue ($\hat{=}$ 17 nmol Substratumsatz/min/mg Protein) nach, was etwa 2,5 % der von ihnen gefundenen Aktivität in Rattenleber entspricht (4110 ± 250 umol Substratumsatz/hr/g wet weight tissue) und gut mit unserem Ergebnis vereinbar ist.

Reichard et al. (49) ermittelten 206 bis 492 umol Substratumsatz/g Gewebe/24 Stunden (Mittelwert: 347), also etwa 1,4 bis 3,4 nmol Substratumsatz/min/mg Protein. Dies sind 10 % der von ihnen ermittelten Aktivität in Lebergewebe. Trotz dieses vergleichsweise hohen Relativanteils sind die Absolutwerte um den Faktor 30-40 niedriger als in unserer Studie.

Für fetales Dünndarmgewebe fanden wir einen Mittelwert von $12,05 \pm 2,6$ nmol Substratumsatz/min/mg Protein (8,9 - 15,0),

also ca. 15 % der postnatalen Aktivität.
Leider liegen hierzu keine Vergleichswerte vor.

Gleiches gilt für den von uns offensichtlich erstmals ermittelten Normwertbereich für Chorionzottenbiopsien. Er beträgt 1,3 - 12,4 nmol Substratumsatz/min/mg Protein (Mittelwert: $5,6 \pm 3,0$). Eine OTC-Aktivität ist also deutlich nachweisbar. Dieses Ergebnis mag zur Vereinfachung der pränatalen OTC-Mangel-Diagnostik in Zukunft beitragen (5,3).

Die vorliegende Studie erzielte - soweit Vergleichswerte vorlagen - gleichwertige bis höhere Normbereiche der OTC-Aktivität in Dünndarmgewebe, und zum Teil deutlich höhere Werte für Leberproben.

Für Chorionzottenbiopsien konnte erstmals ein Normbereich angegeben werden.

Die Nachweisbarkeit der mitochondrialen Harnstoffzyklusenzyme OTC und CPS I in Blutzellen ist - im Gegensatz zu den zweifelsfrei nachgewiesenen zytosolischen Enzymen - umstritten.

Während Wolfe und Gatfield (50) OTC- (128 ± 67 umol Substratumsatz/hr/g Protein = 2,1 nmol/min/mg Protein) bzw. CPS-I-Aktivität ($6,3 \pm 1,7$ umol/hr/g Protein = 0,1 nmol Substratumsatz/min/mg Protein) in Leukozyten feststellten, widersprachen Rabier et al. (51) entschieden diesen Ergebnissen. Sie führen diese von Wolfe und Gatfield gemessenen minimalen Enzymaktivitäten auf spontane Carbamylierung von Ornithin zu Citrullin zurück.

Wir fanden ebenfalls keine OTC- oder CPS-I-Aktivität in Leukozyten.

Unumstritten hingegen ist die immer wieder bestätigte Abwesenheit von CPS I und OTC in Erythrozyten, was auch im Einklang mit unseren Versuchen steht.

5.2.2 Ornithintranscarbamylase-Kinetik

Die Versuche zur Kinetik der OTC ergaben ähnliche Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für die Substrate Ornithin und Carbamylphosphat in den gemessenen Geweben Leber, Jejunum und Chorionzotten.

Für Ornithin beträgt die K_m in Leber 0,5 - 0,65 mmol/l (V_{max} in nmol Substratumsatz/min/mg Protein: 714 - 1111), in Darm 0,55 (V_{max} : 50 - 77) und in Chorionzotten 0,3 (V_{max} : 43).

Pierson et al. (52) geben für Lebergewebe eine K_m von 0,2 mmol/l an, Kalouseks (53) Wert ist 0,4 mmol/l.

Snodgrass (32) fand K_m -Werte im Bereich von $0,43 \pm 0,12$ mmol/l. Der Vergleich der Maximalgeschwindigkeiten ist insofern schwierig, als daß diese von den zitierten Autoren nicht angegeben werden (32) oder nur indirekt aus Graphiken der Studien zu errechnen sind. Diese sind dann 200 (53) bzw. ca. 1000 (52) mal niedriger als von uns gemessen. Leider konnten keine Enzymkinetikstudien in Dünndarmgewebe oder Chorionzotten zum Vergleich herangezogen werden.

Die Michaelis-Menten-Konstanten für Carbamylphosphat als Substrat der OTC betragen in dieser Studie für Lebergewebe 0,3 - 0,4 mmol/l (V_{max} : 363 - 526 nmol Substratumsatz/min/mg Protein), für Jejunum 0,3 mmol/l (V_{max} : 8,7 - 10,0) und für Chorionzotten 0,15 - 0,3 mmol/l (V_{max} : 2,5 - 5,3).

Diese Resultate bestätigen die von Pierson et al. (52): 0,09 mmol/l, Kalousek et al. (53): 0,16 mmol/l, und Snodgrass (32): $0,48 \pm 0,16$ mmol/l, angegebenen K_m -Werte für Lebergewebe in etwa.

Die Maximalgeschwindigkeiten, die von Pierson et al. sowie Kalousek et al. angeführt werden, liegen wiederum um die Faktoren 100 bzw. 1000 niedriger.

Für Dünndarmgewebe und Chorionzottenbiopsien liegen, wie schon erwähnt, keine Enzymkinetikstudien anderer Autoren zum Vergleich vor.

5.2.3 Carbamylphosphatsynthetase-I-Messung

Bei den Messungen der CPS-I-Aktivität in postnatal gewonnenem Lebergewebe ergaben sich Werte von 1,7 - 8,4 (Mittelwert: $4,16 \pm 2,1$) nmol Substratumsatz/min/mg Protein. Diese Werte liegen im unteren Normbereich der von anderen Autoren (2,9,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47) genannten CPS-Aktivitäten, die von 3,65 - 48,3 nmol Substratumsatz/min/mg Protein reichen.

Wir führen unsere vergleichsweise niedrig gemessenen Enzymaktivitäten auf die bekannte Instabilität der CPS I zurück. So konnten beispielsweise Rodeck et al. (46) nachweisen, daß die CPS-I-Aktivität in autopsisch gewonnenem Lebergewebe 12 - 24 Stunden post mortem bereits auf bis zu weniger als 10% verglichen mit biopsisch gewonnenem frischen Lebergewebe abfallen kann.

Obwohl wir unsere Autopsieproben innerhalb weniger Stunden nach Todeseintritt erhielten, wurden diese, wie in 3.1.3 angeführt, zunächst tiefgefroren konserviert und erst zum Test wieder aufgetaut. Studien von Jones et al. (48) belegen, daß die CPS-I-Aktivität in tiefgefrorenem Rattenlebergewebe (- 20°C) schon nach zwei Tagen um etwa 50 % abgefallen ist, dann jedoch über mehrere Wochen hinweg nur noch geringfügig weiter abnimmt. Dies mißt offensichtlich dem Vorgang des Tieffrierens des Gewebes per se die entscheidende Rolle für die Instabilität der CPS I bei. Es ist daher in Zukunft unbedingt anzustreben, Gewebeproben unmittelbar nach Erhalt enzymatisch zu messen.

Die Messungen in fetalem Lebergewebe unterschieden sich nicht signifikant von den Resultaten in postnatalem Gewebe. Der ermittelte Bereich beträgt 2,6 - 7,1 (Mittelwert: $4,7 \pm 1,6$) nmol Substratumsatz/min/mg Protein. Dies bestätigt auch die von Rodeck et al. (46) gemachte

Beobachtung, daß die CPS I - im Gegensatz zur OTC - bereits beim Feten voll entwickelt ist (Rodeck: fetal 1,7 - 20, postnatal 5 - 18 nmol Substratumsatz/min/mg Protein).

Während zahlreiche Untersuchungen zur CPS-I-Aktivität in Lebergewebe vorliegen, haben bisher nur wenige Autoren dieses Enzym in extrahepatischen Geweben nachzuweisen versucht.

Erstmals waren dies Hall et al. 1960 (54), ein Jahr später dann Jones et al. (48). Sie bestimmten eine CPS-I-Aktivität in Rattendünndarm von 10 umol Substratumsatz/gr wet weight tissue/hr (= 1,7 nmol Substratumsatz/min/mg Protein). Hoogenrad et al. (47) schließlich erzielten Meßwerte von $2,13 \pm 0,2$ nmol Substratumsatz/min/mg Protein in humanem Dünndarm.

Die Resultate der vorliegenden Studie liegen mit Werten von 1,1 - 2,6 (Mittelwert: $1,84 \pm 0,62$) im selben Bereich. Dies entspricht, im Einklang mit Hoogenrads Ergebnissen einer ungefähr 50 % Aktivität verglichen mit Lebergewebe.

Diese relativ hohe Aktivität von CPS I in Dünndarmgewebe sollte dazu ermutigen, bei CPS-I-Mangel-Patienten die reduzierten Enzymaktivitäten in Leber- und Dünndarmbiopsien zu vergleichen. Möglicherweise kann die bisher zur definitiven Diagnose der Erkrankung erforderliche Leberbiopsie zukünftig von der mit weniger Komplikationen behafteten Dünndarmbiopsie ersetzt werden.

Solch eine Studie ist wegen der geringen absoluten Fallzahlen jedoch nur schwer realisierbar.

Für fetales Duodenum ergaben sich Aktivitäten von 2,0 - 4,2 (Mittelwert: $3,05 \pm 0,92$) nmol Substratumsatz/min/mg Protein.

Diese Werte sind sogar höher als die Ergebnisse der postnatal gewonnenen Darmgewebsproben, so daß die für Lebergewebe postulierte fetal voll entwickelte CPS-I-Aktivität offensichtlich auch für Dünndarmgewebe zutrifft.

In Chorionzotten der Schwangerschaftswochen 7 - 13 fanden wir CPS-I-Aktivitäten von 1,2 - 7,7 (Mittelwert: $4,2 \pm 1,8$) nmol Substratumsatz/min/mg Protein. Ein Vergleich der Einzelergebnisse in Tabelle 11 läßt dabei keinen signifikanten Enzymanstieg mit fortgeschrittener Schwangerschaftswoche erkennen.

Die Tatsache, daß sich das Enzym CPS I in Chorionzotten nachweisen läßt, mag - ebenso wie für den OTC-Mangel - die schwierige pränatale Diagnostik zukünftig vereinfachen.

5.2.4 Carbamylphosphatsynthetase-I-Kinetik

Kinetik-Studien wurden durchgeführt für NH_4HCO_3 und ATP.

Für ATP errechnen sich aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm Michaelis-Menten-Konstanten von 1,7 bis 2,5 mmol/l (Leber: 1,7, Jejunum: 2,0, Chorionzotten: 2,0 - 2,5), was einer relativ hohen Affinität des ATP für CPS-I entspricht.

Wie auch bei den Versuchen zur Kinetik der OTC ergeben sich für Chorionzotten vergleichbare Maximalumsatz-

geschwindigkeiten (16 - 40 nmol Substratumsatz/min/mg Protein) wie für Dünndarmgewebe (20 - 67). Auffallend ist jedoch der niedrige Wert von 6,3 - 10 für Lebergewebe.

Studien von Pierson und Brien (64) ergaben für MgATP einen K_m -Wert von 1,1 mmol/l in Lebergewebe. Eine noch höhere Affinität fanden Rubio et al. (10), die einen K_m -Wert von 0,26 mmol/l für ATP angeben.

Die Michaelis-Konstanten für NH_4HCO_3 betragen 5 mmol/l (Leber) bzw. 1,8 - 5 mmol/l (Jejunum) bzw. 5,9 - 8 mmol/l (Chorionzotten). Trotz der relativ niedrigen Affinität von NH_4HCO_3 für die CPS-I in Chorionzotten ergibt sich vergleichsweise eine hohe Maximalsubstratumsatzgeschwindigkeit von 7,2 - 13,2 nmol/min/mg Protein (Leber: 9,1; Jejunum: 2,5 - 3,7).

In etwa der gleichen Größenordnung befinden sich die von Pierson und Brien bzw. Rubio et al. angegebenen K_m -Werte. Sie betragen - getrennt in NH_4^+ und HCO_3^- 0,83 bzw. 6,7 mmol/l bei Pierson und Brien (64) sowie 1,3 bzw. 2,2 mmol/l bei Rubio et al. (10).

Da wir in unseren Kinetikstudien jedoch NH_4 und HCO_3^- nicht getrennt untersucht haben, lassen sich unsere Michaelis-Menten-Konstanten für NH_4HCO_3 als Substrat nur schwer mit den Ergebnissen der anderen Autoren vergleichen.

Für Dünndarm- bzw. Chorionzottengewebe konnten keine Vergleichswerte in der Literatur gefunden werden.

5.3 Einsatz der entwickelten Methode in der Pränatalen Diagnostik

Noch vor wenigen Jahren war die pränatale Diagnose von Defekten der mitochondrialen Enzyme des Harnstoffzyklus nicht möglich (3).

Eine gewisse Hilfe beim OTC-Mangel bestand in der Möglichkeit der vorgeburtlichen Geschlechtsbestimmung im Hinblick auf das zu erwartende Ausmaß der eventuell nach der Geburt auftretenden Symptome.

Die intakte Plazentarfunktion verhindert ein Ansteigen des Ammoniakspiegels in der Amnionflüssigkeit von Feten mit Harnstoffzyklusenzymdefekt. Eine Bestimmung desselben mittels Amniozentese bei Risikofeten ist somit als Screening-Verfahren unsinnig.

Ähnliches gilt für den Orotsäurespiegel. Goldstein et al. (15) sowie Ng et al. (55) konnten in zwei Fällen von OTC-Mangel normale Orotsäurespiegel in Amnionflüssigkeit (14. und 19.SSW und unmittelbar nach Geburt) bestimmen.

Studien der letzten Jahre verschiedener Autoren zeigen vielversprechende Ansatzpunkte.

Rodeck et al. stellten 1982 im Lancet die Anwendung der von ihnen entwickelten Methode der Fetoskopie zur Gewinnung von fetalem Lebergewebe in utero (56) zum Zwecke der pränatalen Diagnose des OTC-Mangels vor (46).

Unter Ultraschallkontrolle und streng aseptischen Kautelen wird das "Needlescope" in Lokalanästhesie durch die mütterliche Bauchwand in die Amnionhöhle eingeführt.

Unter direkter Sichtkontrolle wird dann der rechte Rippenbogen des Feten aufgesucht, die Biopsienadel eingeführt und etwas fetales Lebergewebe aspiriert. Mit Hilfe dieser Methode konnten Rodeck et al. bisher einen OTC-Mangel in der 18.SSW diagnostizieren sowie in einem weiteren Fall einen OTC-Mangel in der 21.SSW ausschließen.

Zur internen Kontrolle konnte jeweils eine normale CPS-I-Aktivität bestimmt werden. In beiden Fällen wurde die fetoskopisch-bioptische Diagnose später - postnatal bzw. autoptisch nach dem induzierten Abort - bestätigt werden.

Beide Feten Rodecks waren männlichen Geschlechts. Inwieweit dieses Verfahren auch bei weiblichen Feten, bei denen ja das Ausmaß des Enzymdefekts vom Anteil der Hepatozyten, bei welchen das inaktivierte X-Chromosom das gesunde OTC-Gen trägt, abhängt, erfolgreich angewendet werden kann, bleibt vorläufig dahingestellt. Den relativ späten Zeitpunkt ihres Eingriffs (idealerweise die 20.SSW) begründen Rodeck et al. mit Colombos Ergebnis, daß eine OTC-Aktivität im früheren Fetalleben noch nicht nachweisbar ist (57).

Ebenfalls Studien zur vorgeburtlichen Diagnose des OTC-Mangels führten Old et al. durch (58). Sie benutzten die Technik der direkten Genanalyse. Sie weisen darauf hin, daß in der Mehrheit der OTC-Mangel-Patienten keine Chromosomendeletion vorliegt. In diesen Fällen kann das mutierte Gen - es befindet sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms, Xp21 - mit Hilfe einer RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) genannten Technik nachgewiesen werden. In den wenigen Fällen, in denen eine DNS-Deletion vorliegt, kann diese durch Karyotypisierung und anschließende DNS-Hybridisierung direkt nachgewiesen werden.

Das Diagnosematerial dieser Methode sind Amnionzellen, die im ersten Schwangerschaftstrimester gewonnen werden können.

Analog dazu stellten Fearon et al. (59) eine genetische Analyse des CPS-Mangels vor.

Nussbaum et al. gelang es sogar - ebenfalls auf gen-

technischem Wege - in zwei Stammbäumen die Person auffindig zu machen, bei der die Genmutation für den OTC-Mangel erstmals auftrat (60).

Holzgreve und Golbus konnten Rodecks Erfolge im wesentlichen bestätigen, indem sie ebenfalls in fetoskopisch gewonnenen fetalen Leberbiopsien OTC-Mangel pränatal diagnostizierten (61).

In unserer vorliegenden Studie konnten in Chorionzottenbiopsien direkt, d.h. ohne Anlegen von Zellkulturen, beträchtliche Aktivitäten der OTC und CPS I gemessen werden. In weiteren Studien muß zukünftig gezeigt werden, ob die klinische Anwendung dieses Verfahrens die Diagnose oder den Ausschluß eines OTC- oder CPS-I-Mangels pränatal erlaubt.

Chorionzottenbiopsien wurden von Vimal et al. (62) und Christensen et al. (63) bereits erfolgreich zur pränatalen Messung der Harnstoffzyklusenzyme Argininosuccinat-Synthetase bzw. -Lyase eingesetzt.

Im Vergleich mit den genannten neuen Möglichkeiten der pränatalen Diagnose von OTC- bzw. CPS-I-Mangel bietet die in dieser Studie vorgestellte Meßmethode mit Chorionzottenbiopsien zahlreiche Vorteile.

Sie ist einfach und schnell durchzuführen. Das Anlegen von zeitaufwendigen und damit die Diagnose verzögernden Zellkulturen entfällt. Die Chorionzottenbiopsie kann schon nach wenigen Schwangerschaftswochen erfolgen, also deutlich früher als die zur Genanalyse notwendige Amniozentese.

Im Vergleich zur fetalen Leberbiopsie in utero ist der Zeitvorsprung sogar noch ausgeprägter, außerdem entfallen die bei diesem äußerst invasiven Verfahren möglicherweise auftretenden Komplikationen.

6) ZUSAMMENFASSUNG

Hyperammonämie ist das klinische Leitsymptom der angeborenen Harnstoffzyklusenzymdefekte.

Es handelt sich um lebensbedrohliche Krankheitsbilder, bei denen sich nur durch frühzeitige Diagnose Therapieerfolge erzielen lassen.

Diese Studie konzentrierte sich auf die beiden mitochondrialen Enzyme Carbamylphosphatsynthetase I (CPS I) und Ornithintranscarbamylase (OTC).

Ziel war es, in verschiedenen menschlichen Zellen und Geweben Enzymbestimmungen durchzuführen.

Zu diesem Zwecke wurde eine neue, sensitive Meßmethode entwickelt.

Dabei wurden radioaktiv markierte Substrate eingesetzt:

(14-C)-Carbamylphosphat zur OTC-Messung sowie (32-P)-ATP zur CPS-I-Messung.

Zur Substrat-Produkt-Trennung wurden Ionenaustausch-Minisäulen benutzt. Auf die vergleichsweise aufwendigen photo- und colorimetrischen Verfahren konnte deshalb verzichtet werden.

Für die OTC erhielten wir Maximalsubstratumsatzgeschwindigkeiten, die ein Vielfaches höher lagen als entsprechende Angaben aus früheren Veröffentlichungen, sofern vergleichbare Werte vorlagen.

Die Bestimmungen zur Enzymkinetik bestätigten im wesentlichen die aus der Literatur bekannten k_m -Referenzwerte.

Schwieriger gestalteten sich die Experimente zur CPS I. Sie ist ein ausgesprochen instabiles Enzym, welches sehr empfindlich auf geringste Veränderungen der Versuchsbedingungen (z.B. Reaktionsstop, Lagerung der Proben, Temperatur etc.) reagiert. Im Vergleich mit den Literaturangaben liegen die in dieser Studie ermittelten Werte im unteren Normbereich. Zu etlichen Messungen fehlen vergleichbare Studien.

Sämtliche Studien wurden sowohl mit adultem als auch mit fetalem Leber- und Dünndarmgewebe durchgeführt. Wir konnten bestätigen, daß die CPS I - im Gegensatz zur OTC - bereits in utero voll entwickelt ist.

Die Abwesenheit der mitochondrialen Harnstoffzyklusenzyme in Erythrozyten entspricht den Ergebnissen anderer Autoren.

Die umstrittene, von Wolfe und Gatfield (50) postulierte Nachweisbarkeit von OTC und CPS I in Leukozyten konnte nicht nachvollzogen werden.

Zum bis vor wenigen Jahren noch ungelösten Problem der pränatalen Diagnose von CPS-I- und OTC-Mangelzuständen gibt es mittlerweile verschiedene Zugänge. Es sind dies im wesentlichen die fetoskopische Gewinnung von kindlichem Lebergewebe in utero nach Rodeck et al. (46,56) und die Technik der direkten Genanalyse nach Old et al. (58).

Wir führten Enzymmessungen in Chorionzottenbiopsien mit unserer neuen Methode durch und wiesen sowohl für CPS-I als auch für OTC Aktivität in diesem frühkindlichen Gewebe nach.

In der Kombination unserer einfachen aber sensitiven Meßmethode mit der vergleichsweise risikoarmen Chorionzottenbiopsie in der Frühschwangerschaft sehen wir die Möglichkeit des Ausschlusses bzw. der Bestätigung von CPS-I- oder OTC-Mangel in Familien, in denen bereits Kinder an diesen Enzymdefekten erkrankten oder verstarben.

7. BIBLIOGRAPHIE

- (1) BOLLMAN J.L., MANN F.C., MAGATH T.B.:
Studies on the physiology of the liver.
VIII. Effect of total removal of the liver on
the formation of urea. Amer.J.Physiol. 64:
371 - 392, 1924.
- (2) SHAMBAUGH G.E., MITZGER B.E., FREINKEL N.:
Glutamine-dependent carbamyl phosphate syn-
thetase and fetal structures of the rat.
Biochem.Biophys.Res.Comun. 42: 155, 1971.
- (3) STANBURY J.B., WYNGAARDEN J.B., FREDRICKSON D.S.,
GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S.:
The Metabolic Basis of Inherited Disease,
Mc Graw-Hill Book Company, New York, 1983:
WALSER M.: Urea Cycle Disorders and Other
Hereditary Hyperammonaemic Syndroms, 402 - 438.
- (4) ALLAN J.K., CUSWORTH D.C., DENT C.E., WILSON V.K.:
A disease, probably hereditary, characterized
by severe mental deficiency and a gross abnormality
of amino acid metabolism. Lancet 1: 182 - 187, 1958.
- (5) McMURRAY W.C., RATHBUN J.C., MOHYUDDIN F., KOEGLER S.J.:
Citrullinuria. Pediatrics 32: 347 - 357. 1963.
- (6) RUSSELL A., LEVIN B., OBERHOLZER V.G., SINCLAIR L.:
Hyperammonemia. A new instance of an inborn
enzymatic defect of the biosynthesis of urea.
Lancet 2: 699 - 700, 1962.

- (7) FREEMAN J.M., NICHOLSON J.F., MASLAND W.S.,
ROWLAND L.P., CARTER S.:
Ammonia intoxication due to a congenital defect
in urea synthesis. J. Pediatr. 65: 1039 - 1040, 1964
- (8) TERHEGGEN H.G., LOWENTHAL A., LAVINHA F., COLOMBO J.P.:
Familial hyperargininemia. Arch.Dis.Child. 50:
57 - 62, 1975.
- (9) BACHMANN C., KRÄHENBÜHL S., COLOMBO J.P., SCHUBIGER G.,
JAGGI K.H., TÖNZ O.:
N-Acetylglutamate synthetase deficiency: A dis-
order of ammonia detoxification. N.Engl.J.Med. 304:
543, 1981.
- (10) RUBIO V., FAMPONI G., GRISOLIA S.;
Carbamoyl phosphate synthetase I of human liver:
Purification, some properties and immunological
crossreactivity with the rat liver enzyme.
Biochim.Biophys.Acta 659: 150, 1981.
- (11) KIM S., PAIK W.K., COHEN P.P.:
Ammonia intoxication in rats: Protection by N-
carbamoyl-L-glutamate plus L-arginine. Proc.Natl.
Acad.Sci.USA 69: 3530, 1972.
- (12) LEVIN B., OBERHOLZER V.G., SINCLAIR L.:
Biochemical investigations of hyperammonemia.
Lancet 2: 170, 1969.
- (13) CHATELINEAU L., NAVARRO J., POLONOVSKI C., SAUDUBRAY J-M.:
X-linked transmission of structural gene mutations
responsible for ornithine-transcarbamylase de-
ficiencies. Lancet 1: 261, 1973.

- (14) McREYNOLDS J.W., MANTAGOS S., BRUSILOV S., ROSENBERG L.E.:
Treatment of complete ornithine transcarbamylase deficiency with nitrogen-free analogues of essential amino acids. J.Pediatr. 93: 421, 1978.
- (15) GOLDSTEIN A.S., HOOGENRAAD N.J., JOHNSON J.D., FUKA-NAGA K., SWIERCZEWSKI E., CANN H.M., SUNSHINE P.:
Metabolic and genetic studies of a family with ornithine transcarbamylase deficiency. Pediat.Res. 8: 5 - 12, 1974.
- (16) LABRECQUE D.R., LATHAM P.S., RIELY C.A., HSIA Y.E., KLATSKIN G.:
Heritable urea cycle enzyme deficiency - liver disease in 16 patients. J.Pediatr. 94: 580, 1979.
- (17) SHIH V.E.:
Urea cycle disorders and other congenital hyperammonemic syndromes, in Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S. (eds.): The metabolic basis of inherited disease, ed 4. New York, McGraw-Hill Book Co., 1978, p 362.
- (18) PETRIDES P.E.:
Intermediärstoffwechsel IV: Aminosäuren.
In: Löffler G., Petrides P.E., Weiss L., Harper H.A.: Physiologische Chemie. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2.Auflage 1979.
- (19) WEIL-MALHERBE H.:
Ammonia metabolism in the brain. In: Elliott K.A.C., Page I.H., Quastel J.H. (eds.): Neurochemistry. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, Publisher, 1962 p. 321.

- (20) BACHMANN C., COLOMBO J.P.:

Hyperammonämie: Ein Vorschlag für das diagnostische und therapeutische Vorgehen.
Pädiatrie und Pädol. 17: 141 - 148, 1982.

- (21) BATSHAW M.L., BRUSILOV S.W.:

Treatment of hyperammonemic coma caused by in-born errors of urea synthesis. J.Pediatr. 97: 893, 1980.

- (22) DONN D.M., SWARTZ R.D., THOENE J.G.:

Comparison of exchange transfusion, peritoneal dialysis, and hemodialysis for the treatment of hyperammonemia in an anuric newborn infant. J.Pediatr. 95: 67, 1979.

- (23) BATSHAW M.L., BRUSILOV S., WALSEF M.:

Longterm management of a case of carbamylphosphate synthetase deficiency using ketoanalogues and hydroxyanalogues of essential amino acids. Pediat. 58, 227 - 235, 1976.

- (24) HARRIS D.J., YANG B.J.Y., WOLF B., SNODGRASS P.J.:

Dysautonia in an infant with secondary hyperammonemia due to propionyl coenzyme A carboxylase deficiency. Pediatrics 65: 107, 1980.

- (25) GAUTIER C., HABECHI Z., BELBEKOUCHE M., VAILLANT R.:

Effects of corticosteroids and pancreatic hormones on carbamyl phosphate synthetase-I and ornithine transcarbamylase activities in fetal rat liver. Biol.Neonate 48: 285 - 291, 1985.

- (26) BRUSILOV S.W., VALLE D.L., BATSHAW M.L.:

New pathways of nitrogen excretion in inborn errors of urea synthesis. Lancet II, 452 - 454, 1979.

- (27) LEWIS H.B.:

Studies in the synthesis of hippuric acid in the animal organism. II. The synthesis and rate of elimination of hippuric acid after benzoate ingestion in man. J.Biol.Chem. 18: 225, 1914.

- (28) LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J.:

Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265 - 275, 1951.

- (29) SHIN Y.S., MORO V., DOLIWA H., ENDRES W.:

A radiotopic method for fructose-1-phosphate aldolase assay that facilitates diagnosis of hereditary fructose intolerance. Clin.Chim 29: 1955 - 1958, 1983.

- (30) ARCHIBALD R.M.;

Determination of citrulline and allantoine and demonstration of citrulline in blood plasma. J.Biol.Chem. 156: 121, 1944.

- (31) BROWN Jr. G.W., COHEN P.P.:

Comparative biochemistry of urea synthesis. I. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. J.Biol.Chem.234: 1770, 1959.

- (32) SNODGRASS P.J.;

The effects of pH on the kinetics of human liver ornithinecarbamyl phosphate transferase. Biochemistry 7: 3047 - 3051, 1968.

- (33) SCHACHAT F.H., HOGNESS D.C.:
Repetitive sequences in isolated Thomas Circles
from *Drosophila melanogaster*. Cold Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 371 -375, 1973.
- (34) RAIJMAN L.:
Citrulline synthesis in rat tissues and liver
content of carbamoyl phosphate and ornithine.
Biochem.J. 138: 225 - 232, 1974.
- (35) KANG E.S., SNODGRASS P.J., GERALD P.S.:
Ornithine transcarbamylase deficiency of the
newborn infant. J.of Pediatr. 82: 642 -649, 1973.
- (36) GELBARD A.S., KASEMAN D.S., ROSENSPIRE K.C.,
MEISTER A.:
Enzymatic syntheses of carbamyl phosphate,
L-Citrulline, and N-Carbamyl L-Aspartate labeled
with either ^{13}N or ^{11}C . Int.J.Nucl.Med.Biol. 12:
235 -242, 1985.
- (37) NUZUM C.T., SNODGRASS P.J.:
Urea cycle enzyme adaptation to dietary protein
in primates. Science 172: 1042, 1971.
- (38) NUZUM C.T., SNODGRASS P.J.:
Multiple assays of the five urea-cycle enzymes
in human liver homogenates, in: Grisolia S.,
Báguena R., Mayor F. (eds): The urea cycle.
New York, John Wiley & Sons, Inc., p 325, 1976.

- (39) SHORT E.M., CONN H.O., SNODGRASS P.J., CAMPBELL A.G.M.,
ROSENBERG L.E.:
Evidence for X-linked dominant inheritance of
ornithine transcarbamylase deficiency.
N.Engl.J.Med. 288: 7, 1973.
- (40) BALLARD R.A., VINOCUR B., REYNOLDS J.W., WENNBERG R.P.,
MERRITT A., SWEETMAN L., NYHAN W.L.:
Transient hyperammonemia of the preterm infant.
N.Engl.J.Med. 299: 920, 1978.
- (41) FARRIAUX J.P., PONTE C.L., POLLITT R.J., LEQUIEN P.,
FORMSTECHER P., DHONDT J.L.:
Carbamyl phosphate synthetase deficiency with
neonatal onset of symptoms.
Acta Paediatr. Scand. 66: 529, 1977.
- (42) CATHELINEAU L., BRIAND P., PETIT F., NUYTS J-P.,
FARRIAUX J.P., KAMOUN P.P.:
Kinetic analysis of a new human ornithine
carbamoyltransferase variant.
Biochim.Biophys. Acta 614: 40, 1980
- (43) YAMAUCHI M., KITAHARA T., FUJISAWA K., KAMEDA E., TAKASAKI S.,
KOMORI R., SAHEKI T., KATSUNUMA T., KATURUMA N.:
An autopsied case of hypercitrullinemia in an adult
caused by partial deficiency of liver argininosuccinate
synthetase.
Acta Hepatol.Jap. 21: 326, 1980.

- (44) McREYNOLDS J.W., CROWLEY B., MAHONEY M.J., ROSENBERG L.E.:
Autosomal recessive inheritance of human mitochondrial
carbamyl phosphate synthetase deficiency.
Am.J.Hum.Genet. 33: 345, 1981.
- (45) VAN DEP HEIDEN C., BAKKER H.D., DESPLANQUE J., BRINK M.,
DE BREE P.K., WADMAN S.K.:
Attempted dietary treatment of a boy with hyper-
ammonemia due to ornithine transferase deficiency.
Eur.J.Pediatr. 128: 261, 1978.
- (46) RODECK C.H., PEMBEFY M.E., PATFICK A.D., TZANNATOS C.,
WHITFIELD A.E.:
Fetal liver biopsy for prenatal diagnosis of
ornithine carbamyl transferase deficiency.
Lancet II, 297 - 299, 1982.
- (47) HOOGENRAAD N.J., MITCHELL J.D., DON N.A., SUTHERLAND T.M.,
MC LEAY A.C.:
Detection of carbamyl phosphate synthetase I
deficiency using duodenal biopsy samples.
Arch.Dis.Child. 55: 292 - 295, 1980.
- (48) JONES M.E., ANDERSON A.D., ANDERSON C., HODES S.:
Citrulline synthesis in rat tissues.
Arch. Biochem.Biophys. 95: 499 - 507, 1961.
- (49) REICHARD H.:
Ornithine carbamyl transferase activity in human
tissue homogenates.
J.Lab.Clin.Med. 56: 218 -221, 1960.

- (50) WOLFE D.M., GATFIELD P.D.:
Leucocyte urea cycle enzymes in hyperammonemia.
Pediatr.Res. 9: 531, 1975.
- (51) RABIER D., CATHELINEAU L., KAMOUN P.:
Letter to the editor: Lack of mitochondrial
enzymes of the urea cycle in human white blood
cells.
Pediatr.Res. 13: 207, 1979.
- (52) PIERSON D.L., COX S.L., GILBERT B.F.:
Human ornithine transcarbamylase. Purification
and characterization of the enzyme from normal
liver and the liver of a Reye's syndrome patient.
J.Biol.Chem. 252: 6464, 1977.
- (53) KALOUSEK F., FRANCOIS B., ROSENBERG L.E.:
Isolation and characterization of ornithine trans-
carbamylase from normal human liver.
J.Biol.Chem. 253: 3939, 1978.
- (54) HALL L.M., JOHNSON R.C., COHEN P.P.:
The presence of carbamyl phosphate synthetase
in intestinal mucosa.
Biochim.Biophys.Acta 37: 144 - 145, 1960.

- (55) NG WG, DIZUMI J., KOCH R., SHAW K.N.F., McLAREN J.,
DONNEL G.N., CARTER M.:
Carrier detection of urea cycle disorders.
Pediatrics 68: 448 - 452, 1981.
- (56) RODECK C.H.:
Fetoscopy guided by real-time ultrasound for pure
fetal blood samples, fetal skin samples and
examination of the fetus in-utero.
Br.J.Obstet.Gynaecol. 87: 449 - 456, 1980.
- (57) COLOMBO J.P.:
Congenital disorders of the urea cycle and ammonia
detoxification. Monographs in paediatrics, vol. 1.
Basel: S. Karger, 1971 .
- (58) OLD J.M., PURVIS-SMITH S., WILCKEN B., PEARSON P.,
WILLIAMSON R., BRIAND P.L., HOWARD N.J., HAMMOND J.,
CATHELINEAU L., DAVIES K.E.:
Prenatal exclusion of ornithine transcarbamylase
deficiency by direct gene analysis.
Lancet I: 73, 1985.
- (59) FEARON E.R., MALLONEE R.L., PHILLIPS J.A., O'BRIEN W.E.,
BRUSILOV S.W., ADCOCK M.W., KIRBY L.T.:
Genetic analysis of carbamyl phosphate synthetase I
deficiency. Hum.Genet. 70: 207 - 210, 1985.
- (60) NUSSBAUM R.L., BOGGS B.A., BEAUDET A.L., DOYLE S.,
POTTER J.L., O'BRIEN W.E.:
New mutation and prenatal diagnosis in ornithine
transcarbamylase deficiency.
Am.J.Hum.Genet. 38: 149 - 158, 1986.

- (61) HOLZGREVE W., GOLBUS M.S.:
Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase
deficiency utilizing fetal liver biopsy.
Am.J.Hum.Genet. 36: 320 - 328, 1984.
- (62) VIMAL C.M., FENSOM A.H., HEATON D., WARD R.H.T.,
GARROD P., PENKETH R.J.A.:
Prenatal diagnosis of argininosuccinicaciduria
by analysis of cultured chorionic villi.
Lancet I: 521, 1984.
- (63) CHRISTENSEN E., BRANDT N.J., PHILIP J., BANG J.:
Exclusion of citrullinaemia in the first
trimester of pregnancy by direct assay of
argininosuccinate synthetase in chorionic
villi.
Prenatal Diagnosis 5: 299 - 301, 1985.
- (64) PIERSON D.L., BRIEN J.M.:
Human carbamylphosphate synthetase I:
Stabilization, purification, and partial
characterization of the enzyme from human liver.
J.Biol.Chem. 255: 7891, 1980.

8) LEBENS LAUF

Name: Ulrich Heininger
Geboren: 21. August 1961 in München
Eltern: Dipl. Ing. Hansfritz und
Erika Heininger, geb. Biberacher

Schulausbildung

Grundschule: 1967 - 1971 in Karlsfeld
Gymnasium: 1971 - 1980 in Dachau
Allgem. Hochschulreife: Juni 1980

Grundwehrdienst Juli 1980 - April 1981

Medizinstudium

Zulassung: zum Sommersemester 1981 an der
Ludwig-Maximilians-Univ. München
Ärztliche Vorprüfung: März 1983
1. Staatsexamen: März 1984
Dissertation: Beginn im April 1984 im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Universität München
2. Staatsexamen: März 1986
Praktisches Jahr: University of California San Diego
(April - Juni 1986)
University of Birmingham, England
(Juni - August 1986)
Chirurg. Klinik und Poliklinik der
Universität München im Klinikum
Großhadern (August - November 1986)
Dr. von Haunersches Kinderspital
der Universität München
(Dezember 1986 - März 1987)
3. Staatsexamen: Mai 1987

